DIE
BILDUNG VON ACETYLCHOLIN UND DER STOFFWECHSEL VON GEHIRN UND PERIPHEREN NERVEN IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION

DER

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II DER UNIVERSITÄT BERN
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

VORGELEGT VON

MANUEL C. SANZ
VON BOLLIGEN UND BERN

Von der Philosophischen Fakultät II auf Antrag des Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen.

Bern, den 7. Juli 1943.

Der Dekan: *Rudolf Signer.*

Buchdruckerei Vogt-Schild A.-G., Solothurn
1944

DIE
BILDUNG VON ACETYLCHOLIN UND DER STOFFWECHSEL VON GEHIRN UND PERIPHEREN NERVEN IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION

DER

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II DER UNIVERSITÄT BERN
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

VORGELEGT VON

MANUEL C. SANZ
VON BOLLIGEN UND BERN

Von der Philosophischen Fakultät II auf Antrag des Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen.

Bern, den 7. Juli 1943.

Der Dekan: *Rudolf Signer.*

Buchdruckerei Vogt-Schild A.-G., Solothurn
1944

Die vorliegende Arbeit wurde im Hallerianum, Physiologischen Institut der Universität Bern, unter der Leitung von Herrn *Prof. Dr. A. v. Muralt* und Herrn *Prof. Dr. R. Signer* ausgeführt. Ich nehme gerne die Gelegenheit wahr, meinen verehrten Lehrern an dieser Stelle für ihre wertvollen Ratschläge und ihr grosses Interesse an meiner Arbeit, sowie für ihr Entgegenkommen meinen besten Dank auszusprechen.

Bern, im April 1943.

Manuel C. Sanz.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 5

1. Arbeiten mit überlebenden Geweben 5
2. Die Bedeutung physikalischer Messmethoden für die Physiologie 7
3. Grundsätzliches zum Stoffwechsel 7
4. Die Wirkstoffe: Fermente, Hormone und Vitamine 9
   a) Azetylcholin 10
   b) Aneurin 11
5. Chemie und Physiologie 12
   a) Chemische Isolierungen 12
   b) Nachweismethoden 13

II. Problemstellung 15

III. Methodisches 18

A. Messung des Stoffwechsels an der Warburg-Apparatur 18
   1. Die Entwicklung der Methode 18
   2. Einfaches Manometer: Prinzip der Methode 19
   3. Apparatur 19
   4. Eichung der Gefässe 20
   5. Material 21
   6. Berechnung des Gaswechsels 22
      a) Die «Gefässkonstante» 22
      b) Gleichzeitige Veränderung des Partialdruckes zweier Gase 24
      c) Berechnung und Bestimmung der Retention 25
   7. Ausführung der Versuche 25

B. Messung von Azetylcholin 26
   1. Spaltung durch Cholinesterase 26
      a) Die Methode 26
      b) Ausführung der Bestimmung 27
      c) Resultate 27
   2. Weitere Nachweismethoden 28
   3. Nachweis am Blutegelpräparat 29

Seite

C. Messung von Aneurin mit der Thiochrommethode 30

1. Die Methode 30
2. Ausführung der Bestimmung 31
   a) Prinzip der Methode 31
   b) Extraktion und Verdauung 32
   c) Erstes Auswaschen mit Isobutanol 32
   d) Oxydation zu Thiochrom 34
   e) Waschen mit H_2O 34
   f) Vergleich der Fluoreszenz 35
   g) Differentiation von Cocarboxylase und Aneurin . . . 35
   h) Berechnung 35
3. Genauigkeit der Methode 36

IV. Untersuchungen am Gehirn 37

A. Experimentelles 37
1. Präparierung des Gehirns 37
2. Lösungen und Ansätze 38

B. Ergebnisse 38

V. Untersuchungen am peripheren Nerven 45

A. Experimentelles 45
1. Gewinnung des Nervenmaterials 45
2. Präparierung der Nerven 46

B. Ergebnisse 46

VI. Besprechung der Ergebnisse 51

A. Gehirn 51
1. Synthese von Azetylcholin 51
2. Atmung und Glykolyse 53
3. Schädigung der Atmung durch Blausäure 53

B. Peripherer Nerv 55
1. Bildung von Azetylcholin 55
2. Gehalt an Aneurin 56
3. Atmung und Glykolyse 56

VII. Zusammenfassung 58

A. Gehirn 58

B. Peripherer Nerv 59

VIII. Literatur 60

I. Einleitung

1. Arbeiten mit überlebendem Gewebe.

Das Arbeiten mit überlebendem Gewebe bringt einige Schwierigkeiten mit sich. Die Gewebe, seien es Organe oder Organstücke, sind aus ihrem physiologischen Zusammenhange gelöst, ihre natürliche Verbindung mit dem ganzen Organismus durch Blut- und Nervenversorgung ist unterbrochen. Um die Agenzien leicht und sicher an die Oberfläche der Zellen oder Zellbruchstücke zu bringen, müssen die Organe weitgehend zerkleinert werden, was natürlich nicht ohne eine gewisse Schädigung erfolgen kann. Warburg hat in schönen Arbeiten aber gezeigt, dass der Stoffwechsel von intakten Seeigeleiern sehr wenig abweicht von demjenigen zerstörter Eier, wobei die Zellen durch Einfrieren und nachheriges Zerreiben der Eier aufgebrochen wurden. Im Laufe der Zeit wurden hauptsächlich zwei Methoden zur Untersuchung des Stoffwechsels von Geweben entwickelt: die der Gewebeschnitte und die des Gewebebreis. Im ersten Falle muss die sogenannte Grenzschnittdicke für jede Art von Gewebe und für jedes einzelne Gas, das zum Austausch gelangt, berechnet werden; im zweiten Falle ist möglichst schnelles Arbeiten und Zerkleinerung bei tiefer Temperatur angezeigt. Das Einfrieren mit flüssiger Luft, wobei die Gewebe glashart werden, gefolgt von einer Zerkleinerung in Gegenwart von Kohlensäure, ergibt eine feine, leicht pipettierbare (und somit auch genau abmessbare) Suspension von Zellstücken, deren chemische Leistungen noch unverändert erhalten bleiben.

Eine Beurteilung des Stoffwechsels wird aber unsicher, wenn ein Gemisch verschiedenartiger Zellen vorliegt. Sollen verschiedene Beeinflussungen untersucht werden in ihrer Wirkung auf die chemischen Umsatzgeschwindigkeiten, so ist die erste Bedingung die, dass die Vorgänge an und für sich konstant sind. Wenn z. B. die Oxydationsgeschwindigkeit dauernd wesentlich abnimmt, so kann man nicht sicher feststellen, wie eine Beeinflussung wirkt. Es müssen also unter gleichen Bedingungen konstante Verhältnisse gegeben sein.

Zur Beeinflussung der chemischen Umsatzgeschwindigkeiten in Zellen können einmal die physikalischen Bedingungen geändert werden, vor allem die Temperatur. Freilich ist der Spielraum in dieser Richtung sehr gering. Vielseitiger ist zweifellos die Beeinflussung durch Chemikalien: Das Milieu der Zelle wird durch Zusatz oder Entfernung von gewissen Stoffen geändert. Dieser Weg hat seit den klassischen Arbeiten von Claude Bernard zu den wichtigsten Ergebnissen geführt.

Wird das Milieu der Zelle geändert, so muss mit Vorsicht die Frage geprüft werden, ob der neue Zustand auch ein Gleichgewichtszustand ist. Wird nicht z. B. der zugesetzte Stoff von der Zelle in solchem Masse aufgenommen, dass seine Konzentration in der Lösung wesentlich abnimmt, oder wird der Stoff nicht durch von der Zelle ausgeschiedene Substanzen gebunden? Bleibt die Wasserstoffionen-Konzentration während des Versuches konstant? Die Unsicherheit, die durch Aufnahme von Stoffen entsteht, lässt sich dadurch vermeiden, dass die Zellen vor dem Versuch mit der Versuchslösung gewaschen werden. Da eine neutrale Lösung durch CO_2-Ausscheidung sauer wird, ist es zweckmässig, zur Konstanthaltung des p_H Puffergemische zu verwenden, z. B. eine Bikarbonat- oder Phosphatlösung.

Es sei nun noch auf einige allgemeine Fehlerquellen hingewiesen. Ein Fehler kann vor allem durch Verunreinigung mit Bakterien entstehen, die ja im Vergleich zu ihrer Masse sehr grosse Umsatzgeschwindigkeiten zeigen. Bei Verwendung von peinlich sauberen Reaktionsgefässen, stets frisch hergestellten Lösungen und Gemischen und durch sofortige Untersuchung des Materials nach dem Tode der Tiere ist eine Fälschung der Ergebnisse durch Bakterien praktisch ausgeschlossen.

Weitere Fehler treten auf, wenn Spuren von Schwermetallionen mit den Zellen in Berührung kommen. Chrom- und Kupferionen sind schon in kleinsten Spuren schwere Zellgifte. Da alle Gefässe, in denen die notwendigen Lösungen bereitet und aufbewahrt werden, und ebenso alle Reaktionsgefässe mit konzentrierter Chrom-Schwefelsäure gereinigt werden müssen, sind sie sehr sorgfältig mit warmem Wasser nachzuspülen. Es ist zu beachten, dass Chromionen von der Glaswand stark adsorbiert werden. Die Gefässe werden zuletzt mit destilliertem Wasser gespült und im Trockenschrank getrocknet. Bei Erhitzen über 160 ° werden sie gleichzeitig sterilisiert. Für alle Lösungen und zur letzten Spülung der Gefässe darf nur Wasser verwendet werden, das aus einer Jenaer Glasapparatur destilliert wurde. Das aus den gewöhnlichen kupfernen Destillationsanlagen stammende Wasser enthält Kupferionen. Aether soll zur Trocknung

nie Verwendung finden, weil Spuren von Aether oder Aetherdämpfen zu Fehlern bei den manometrischen Ablesungen führen. Nur reinste Chemikalien sollen zur Anwendung gelangen. Glukoselösungen müssen jedesmal vor Gebrauch frisch hergestellt werden, da sie sehr gute Nährlösungen für Bakterien sind und daher schon nach einem oder zwei Tagen unbrauchbar werden. Auch glukosefreie Ringerlösungen sollen nicht länger als einige Tage stehen gelassen werden.

2. Die Bedeutung physikalischer Messmethoden für die Physiologie.

«Der wichtigste Schritt in dem Fortschritt einer jeden Wissenschaft ist das Messen von Grössen» (Maxwell in «Theorie der Wärme»). Besser und kürzer lässt sich der Auftrieb nicht in Worte fassen, den die Naturwissenschaften und im besondern die Physiologie von der mathematisch-physikalischen Seite her erhielten. Erst mit der Einführung von exakten physikalischen und chemischen Methoden, verbunden mit genau umrissenen Versuchsbedingungen und klaren Fragestellungen, wurde die Physiologie eine exakte Naturwissenschaft. Eine gute Uebersicht, wie weit die physikalischen Arbeitsmethoden schon Eingang gefunden haben bei physiologischen Untersuchungen, gibt Peterfi: Methodik der wissenschaftlichen Biologie. Bd. 1 und 2.

Im Verlauf der ausgeführten Untersuchungen kam aus der grossen Zahl der physikalischen Messverfahren die von O. Warburg ausgebaute manometrische Messung des Stoffwechsels von überlebenden Geweben zur Anwendung. Die Methode ist im Kapitel III beschrieben.

3. Grundsätzliches zum Stoffwechsel.

Die einfachste praktische Möglichkeit, Auskunft über den Gesamtenergieumsatz sowohl des Körpers als auch von überlebenden Teilen zu erhalten, bietet die quantitative Untersuchung der Atmung. Das Verhältnis von entwickelter Kohlensäure zu verbrauchtem Sauerstoff wird als respiratorischer Quotient ($RQ = \frac{V_{CO_2}}{V_{O_2}}$) bezeichnet.

Er ist bei restloser Verbrennung von Kohlehydrat, Fett und Eiweiss jeweils eine charakteristische Grösse. Wird im Organismus beispielsweise Traubenzucker restlos verbrannt, so ergibt sich, dass aus einem Molekül $C_6H_{12}O_6$ notwendigerweise 6 CO_2 und 6 H_2O

entstehen müssen. Um diese Aufspaltung durchzuführen, ist die Aufnahme von 6 O_2 nötig, der RQ wird also $\frac{6}{6} = 1$.

Ganz anders wird der RQ bei Verbrennung von Fett. Bei restloser Verbrennung des Triglyzerids der Stearinsäure beispielsweise (Bruttoformel $C_{57} H_{110} O_6$) entstehen 57 CO_2 und 55 H_2O, was nur möglich ist unter Aufnahme von 81,5 O_2. Der RQ dieser Verbrennung ist also $\frac{57}{81,5} = 0,70$.

Für die Verbrennung von Proteinen ergab sich ein RQ von durchschnittlich 0,8.

So kann man regelmässig während einer längeren Hungerperiode am Menschen beobachten, dass zunächst in den ersten Stunden der RQ hoch liegt, bei 0,85 — 1. Es wird zuerst der gespeicherte Glykogenvorrat abgebaut. Anschliessend kommt eine mehrtägige Periode mit sehr niederem RQ (gegen 0,7), in welcher die Fettvorräte verbraucht werden. Schliesslich steigt der RQ wieder leicht an unter gleichzeitigem Anstieg der N-Ausscheidung im Harn: es wird bereits Körpereiweiss abgebaut.

Die Bestimmung des RQ vermittelt also unter Umständen eine Vorstellung über die Art der verbrannten Stoffe. Wenn man somit aus dem RQ ersieht, *was*, aus dem O_2-Verbrauch aber *wieviel* verbraucht wird und von den verbrannten Substanzen die im Wassercalorimeter ermittelten Wärmewerte Cal/lg kennt, so lässt sich aus der Messung der CO_2-Ausscheidung und der O_2-Aufnahme der Gesamtenergieumsatz in Kalorien angeben. Dies ist die Grundlage für die sogenannte indirekte Kalorimetrie. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass wohl Kohlehydrate und Fette im Organismus letzten Endes zu CO_2 und H_2O abgebaut werden, nicht aber die Eiweisskörper, aus welchen auch noch Endprodukte erheblichen Energieinhaltes entstehen (Harnstoff, Kreatinin, NH_3), so dass ihre energetische Ausnützung eine unvollkommene ist.

Neben der *Atmung* spielt im Stoffwechsel von tierischem Gewebe auch die Milchsäurebildung oder die *Glykolyse* eine wesentliche Rolle. Ihre Bruttogleichung lautet:

$$C_6 H_{12} O_6 \longrightarrow 2\ CH_3\ CHOH\ COOH.$$

Es ist klar, dass die Glykolyse hauptsächlich beim Fehlen von Sauerstoff eintritt oder wenn Blausäure zugegeben wird, welche schon in ganz geringen Mengen die Oxydation im Gewebe fast vollständig hemmt (Vergiftung von Atmungsfermenten). Aerobe Glykolyse tritt aber auch stets neben der Sauerstoffatmung in kleinerem oder grösserem Masse auf, je nach dem Zustand des Gewebes und

nach der Art des Substrates (ob z. B. Glukose anwesend ist oder nicht).

Dem Experimentator stehen zur Untersuchung des für die ganze Grundlagenforschung der Physiologie so wichtigen Stoffwechsels sowohl des Körpers als auch von einzelnen Organen oder Gewebeteilen eine ganze Reihe von Verfahren zur Verfügung, die alle prinzipiell den Sauerstoffverbrauch und die Kohlensäureentwicklung (oft auch noch die Wasserabscheidung) zu messen gestatten. Die Messung von Stoffwechselvorgängen in Gewebeschnitten oder -brei geschieht heute fast ausschliesslich mit manometrischen Methoden, weil sie genauer und bequemer sind als die chemischen.

4. Die Wirkstoffe: Fermente, Hormone und Vitamine.

In jedem Organismus kommen eine Reihe von verschiedenen Stoffen vor oder müssen ihm mit der Nahrung zugeführt werden, durch deren besondere chemische Struktur im Verein mit dem eigenartigen kolloidchemischen Aufbau des Protoplasmas die Leistungen der Zellen während des Lebens möglich gemacht werden. Diese Stoffe werden als *Wirkstoffe* bezeichnet. Der Aufbau und Umbau der mit der Nahrung zugeführten Substanzen oder derjenige der zelleigenen Stoffe bedarf der Mitwirkung besonderer katalytischer Einrichtungen der Zelle, der *Fermente.*

Die Tätigkeit der Fermente ist in den meisten Fällen (Ausnahmen sind z. B. die Verdauungsfermente) an die Zellen gebunden. Ihr Einsatz im Dienste des Gesamtorganismus ist aber nur möglich, wenn der Körper über eine entsprechende Regulation verfügt. Ausser der nervösen Regulation und im Zusammenwirken mit ihr gibt es eine Regulation durch chemische Stoffe, die mit dem Blutstrom überall im Körper verbreitet werden. Diese Art der Regulation wird deshalb der nervösen als humorale gegenübergestellt. Solche Stoffe, die in einigen Organen von spezifischem Bau gebildet werden und, humoral weiterbewegt, in anderen Organen spezifische Wirkungen auslösen, werden *Hormone* genannt.

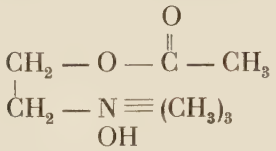
Die *Vitamine* schliesslich sind Stoffe, die der Körper nicht zu bilden vermag, sondern die ihm mit der Nahrung von aussen zugeführt werden müssen. Ihr Fehlen führt zu den sogenannten Mangelkrankheiten.

Die in ihrer chemischen Struktur aufgeklärten und der Synthese zugänglichen Fermente, Hormone und Vitamine gehören sehr verschiedenen Stoffgruppen an. Da bestimmte Vitamine als integrierender Bestandteil von Fermenten in die Struktur des Körpers ein-

gebaut werden und so ihre spezifische Wirkung auf ganz verschiedenem Wege entfalten können, wird offenbar, dass die Grenzen zwischen den Vitaminen, Hormonen und Fermenten fliessend sind.

Allen Wirkstoffen aber ist eines gemeinsam: ihre Konzentration in den Geweben oder die Menge, die von ihnen dem Organismus zugeführt werden muss, ist ausserordentlich geringfügig.

a) Azetylcholin:



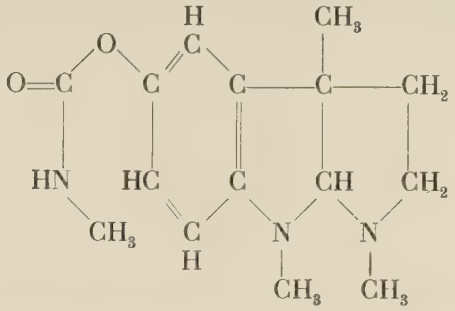
Vorkommen, Wirkung und Bedeutung. Azetylcholin ist ein sogenanntes Gewebshormon. Es kann als ziemlich sicher gelten, dass Azetylcholin — wie viele Gewebshormone — im Gewebe selber am Orte seiner Wirkung als Folge des nervösen Reizes an peripheren Nervenendigungen entsteht, was für die Erkenntnis der Mechanismen der nervös-humoralen Uebertragung besonders wichtig ist.

Im allgemeinen entspricht die Wirkung des Azetylcholins einer Reizung parasympathischer Nerven: Es wirkt also auf das Herz hemmend, auf die Darmperistaltik fördernd und setzt wegen Gefässerweiterung in der Peripherie den Blutdruck herab. Es ist nachgewiesen worden, dass bei der Reizung parasympathischer, aber auch der rein motorischen Nerven in den Erfolgsorganen Azetylcholin freigesetzt wird. Dieser Vorgang ist offenbar ein wesentliches Glied in der Kette der Vorgänge bei der Uebertragung nervöser Reize. Nicht nur als Vermittlersubstanz zwischen zwei Geweben — z. B. an der motorischen Endplatte — wirkt Azetylcholin, sondern auch bei der Leitung des nervösen Reizes im Nerven als Aktionssubstanz, und zwar nach neuern Ergebnissen zusammen mit Aneurin.

Auch im Gehirn wurde das Vorkommen und die Bildung von Azetylcholin nachgewiesen. Bei Zusatz von Azetessigsäure zu Gehirn — Cholin ist immer im Ueberschuss vorhanden aus den Lezithinen — verstärkt sich die Bildung des Azetylcholins, so dass es sich sehr wahrscheinlich um einen enzymatisch gesteuerten Vorgang handelt. Die stärkste Azetylcholinbildung wurde in den basalen Ganglien gefunden.

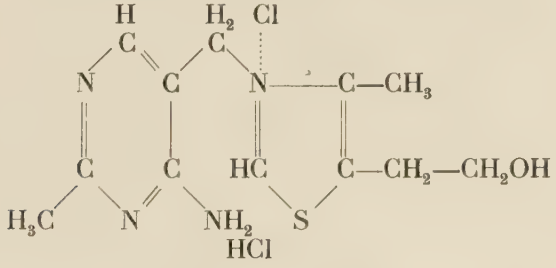
Die Freisetzung von Azetylcholin an den Nervenendigungen durch die Erregung, die ein Organ in Tätigkeit versetzt, bewirkt gleichzeitig auch eine bessere Durchblutung des tätigen Organs. Die Wirkung des Azetylcholins ist ausserordentlich flüchtig, da es durch

ein im Blutserum vorkommendes und an der Nervenendplatte besonders reichlich vorhandenes Ferment — die Cholinesterase — sehr rasch gespalten wird (zirka in einer Zehntausendstelssekunde). Dagegen ist bei schweren Muskelerkrankungen der Gehalt des Blutes an Cholinesterase herabgesetzt. Durch Physostigmin (Eserin)



wird die Cholinesterase gehemmt, so dass bei Gegenwart von Eserin Azetylcholin im Blute mit pharmakologischen Methoden nachgewiesen werden kann. Isoliert und chemisch identifiziert wurde das Azetylcholin im Tierkörper in der Milz, im Gehirn und im Blut.

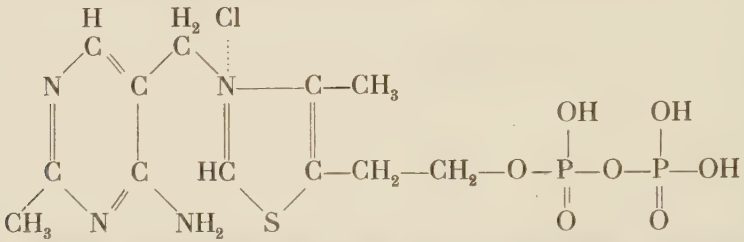
b) Aneurin, Thiamin, Vitamin B_1:



Das beim Fehlen des Vitamins B_1 auftretende Krankheitsbild der *Beriberi* ist ausser durch die neuritischen Störungen gekennzeichnet durch die Ausbildung von Oedemen sowie durch schwere Veränderungen der Herzfunktion. Die charakteristische Zunahme des Fettgehaltes im Blut, Lipämie, ist wahrscheinlich eine Folge der erheblichen Vergrösserung der Nebennierenrinde beim Fehlen des Vitamins. Die neuritischen Erscheinungen und die mangelhafte Herzfunktion beruhen auf einer Störung des Kohlehydratstoffwechsels im zentralen und peripheren Nervensystem und im Herzen. Diese Störung zeigt sich auch im Auftreten von Brenztraubensäure im Blut, sie betrifft den Endabbau des Zuckers. Neben der Wirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel kann das Aneurin als Wirkstoff

auch bei andern Stoffwechselvorgängen eine Rolle spielen. Verschiedene neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass solche Vorgänge beim Erregungsprozess im Nerven vorliegen. Offenbar ist das Aneurin im ruhenden Nerv in einer Vorstufe oder Bindung vorhanden, aus der es bei der Erregung in eine locker gebundene Form übergeht, die leichter zu extrahieren ist. Eine Speicherung des Vitamins B_1 erfolgt in Herz und Leber, in zweiter Linie im Muskel.

Die Pyrophosphorsäureverbindung des Vitamins B_1 ist das CO-Ferment der Carboxylase, die Cocarboxylase,



unter deren Mitwirkung sich die Decarboxylierung von Ketosäuren in den nächst niederen Aldehyd vollzieht, z. B.:

$$\underset{\text{Brenztraubensäure}}{CH_3\,CO\,COOH} \longrightarrow \underset{\text{Azetaldehyd}}{CH_3\,CHO} + CO_2$$

5. Chemie und Physiologie.

Die Erforschung der grundlegenden Lebensvorgänge, wie Aenderungen im inneren Milieu, Resorption, Zwischenstoffwechsel, Muskelphysiologie und die gesamten Hormon- und Fermentwirkungen konnten erst an die Hand genommen werden, nachdem die Chemie so weit entwickelt worden war, dass sie mit Erfolg zur Abklärung von so komplizierten Gleichgewichten und chemischen Reaktionen antreten konnte sowie zur Isolierung und Erkennung von so geringen Stoffmengen, wie sie in der Natur vorkommen. Aus der Wechselwirkung von Chemie und Physiologie ergaben sich für beide Teile sehr fruchtbare Anregungen und Probleme, welche heute im Mittelpunkt des Interesses stehen (Chemotherapeutik, Hormonpräparate usw.).

a) Chemische Isolierungen.

Am Beispiel der Abscheidung und Identifikation des Azetylcholins durch E. und E. Stedman [1] soll der Verlauf einer solchen Isolierung kurz dargestellt werden.

Es wurden Ochsengehirne verarbeitet. 40 Ochsengehirne (mittleres Gewicht 200 g) mussten, da nach Untersuchungen am Blut-

egelpräparat pro Gehirn 1,2 mg Azetylcholin zu erwarten war, zirka 48 mg Azetylcholin ergeben. Die Gehirne wurden so schnell wie möglich entfernt, zerkleinert, portionenweise im Mörser zerrieben und mit der gleichen Gewichtsmenge Chloroform (das Eserinbase zur Inaktivierung der Cholinesterase 1 : 1000 enthielt) während je 2 h bei 37 ° stehen gelassen. Nach dieser Inkubationszeit, während der die Bildung von Azetylcholin erfolgte, wurde die Synthese unterbrochen durch Zugabe von Alkohol, und zwar wurden 1 l Alkohol pro 50 ml Chloroformsuspension zugefügt. Die Suspension wurde über Nacht stehen gelassen, filtriert, mit Alkohol gewaschen und das Filtrat samt Waschlösung bei 35—40 ° im Vakuum zur Trockene eingedampft. Auf diese Art musste die berechnete Menge Azetylcholin von 48 mg, vermischt mit 2 g Eserin, anfallen. Da alle Methoden der Fällung von Azetylcholin (als Reineckat, Chloroplatinat, Chloroaureat) auch mit Eserin Fällungen ergeben, musste ein Verfahren gefunden werden, um diese zwei Substanzen zu trennen. Normalerweise würde man zur Trennung des Eserins von einem quaternären Salz dieses mit Aether oder Chloroform aus alkalischer Lösung ausschütteln. Azetylcholin ist jedoch sehr empfindlich gegen alkalische Lösungen.

Zur ersten groben Trennung wurde das Azetylcholin mit Trichloressigsäure gefällt. Dann wurde mit gesättigter, wässeriger Lösung von $NaHCO_3$ ganz leicht alkalisch gemacht und sechsmal mit Chloroform extrahiert. Schliesslich wurde mit Weinsäure die Lösung leicht sauer gemacht und so das Azetylcholin abgespalten. Nach der Fällung des Azetylcholins als Reinéckat wurde dieses mit Silbersulfat gespalten und überschüssiges Sulfat mit Bariumchlorid entfernt. Dann wurde Azetylcholin als Chloroplatinat durch wiederholtes Fällen gereinigt und schliesslich als Chloroaureat identifiziert.

Durch diese sehr mühseligen und schönen Arbeiten wiesen die Autoren nach, dass es tatsächlich Azetylcholin ist, das durch das Gehirngewebe synthetisiert wird.

b) Nachweismethoden.

Sobald die einzelnen Wirkstoffe (Vitamine, Hormone und Fermente) bekannt waren, stellte sich das Verlangen nach deren quantitativer Messung ein. Es wurden auch in einigen Fällen chemische Methoden gefunden, auf denen solche Messverfahren in genügend grosser Empfindlichkeit entwickelt werden konnten.

Die Bestimmung des Vitamins B_1 durch Oxydation zum stark fluoreszierenden Thiochrom ist ein Musterbeispiel einer solchen chemischen Bestimmung. Die Methode wird in Kapitel III ausführlich dargestellt.

In den meisten Fällen bleibt man aber für die Bestimmung physiologischer Mengen von Wirksubstanzen auf biologische Messmethoden angewiesen. Diese sind durch ihre ungeheure Empfindlichkeit ausgezeichnet. Die grosse Spezifität in der Wirkungsweise der meisten Wirksubstanzen erlaubte die Ausarbeitung von sehr zuverlässigen Testmethoden, welche in der Regel international standardisiert wurden.

Azetylcholin kann nur biologisch mit genügender Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Alle Nachweisverfahren gründen sich auf seiner Wirkung auf die verschiedensten Organe, welche im Kapitel III aufgezählt werden. Das angewandte Messverfahren wird dort kurz beschrieben.

II. Problemstellung

Die grossen Erfolge der Muskelphysiologie, die zu einer weitgehenden Abklärung der chemischen Vorgänge in der Ruhe und bei der Kontraktion geführt haben, gaben den Ansporn, auch beim Nerv, im Zusammenhang mit dem Erregungsvorgang, nach chemischen Umsetzungen zu suchen. Die geringen Mengen an Substanz und isolierbaren Stoffen lassen jedoch eine chemische Bearbeitung wie beim Muskel nicht in gleichem Umfang zu. Ausserdem zeigt der Nerv eine ganz andere *chemische Zusammensetzung* als der Muskel, so dass die beim Muskel gewonnenen Einblicke nur mit Vorsicht übertragen werden dürfen.

Der N. ischiadicus des Frosches, der hauptsächlich untersucht wurde, enthält zirka 75 % Wasser, 17 % Lipoide. Die Achsenzylinder betragen im Mittel 25 –50 % der Nervenfaser ohne Neurilemm und Bindegewebe. Die Kreatinkonzentration des ganzen Nerven beträgt weniger als ein Drittel der des Muskels, aber im Achsenzylinder ist sie höher als im Muskel. Die Kreatinkonzentration ist 0,13 %, wird aber im Achsenzylinder auf zirka 1,2 % geschätzt. Histochemische Studien ergaben eine grosse Anreicherung des Kaliums in den Ranvierschen Schnürringen und eine ganz geringe Menge im sogenannten internodalen Abschnitt. Auch Chloride wurden in grossen Konzentrationen in den Schnürringen von myelinhaltigen Fasern gefunden.

Ein anderer grosser Unterschied zwischen Muskel und Nerv besteht in der Wärmeproduktion während maximaler Tätigkeit, der sogenannten *Aktionswärme*. Sie ist beim Muskel 8000mal grösser als beim Nerv (1a). Die Aktionswärme des Nerven ist so gering, dass sie lange Zeit überhaupt nicht messbar war, so dass es fraglich schien, ob der Nerv überhaupt einen Aktionsstoffwechsel besitzt. Zwei bekannte Erscheinungen des Nerven jedoch liessen von allem Anfang an auf eine Beziehung zwischen Stoffwechsel und Erregungsvorgang schliessen:

Das Alles-oder-Nichts-Gesetz und die auf eine Erregung folgende Refraktärphase.

Heute sind neben der messbaren Aktionswärme auch andere Erscheinungen des Aktionszustandes des Nerven bekannt. Der Zustand, in welchem sich die erregte Stelle eines Nerven befindet, wird als *Aktionszustand* bezeichnet. Darunter versteht man die Gesamtheit der Aenderungen, die sich an der erregten Stelle abspielen. Den Aktionszustand als solchen wird man erst beschreiben können, wenn der grössere Teil der sich abspielenden Aenderungen einmal bekannt sein wird.

Bis jetzt ist von diesen Aenderungen vor allem eine Gruppe der Erscheinungen sehr genau erfasst worden: die elektrischen Erscheinungen. Sie sind aber nur *eine* Aeusserung des Aktionszustandes, die mit den zur Verfügung stehenden Methoden und Messinstrumenten besonders genau erfasst und untersucht werden konnte [9].

Eine dritte bekannte Aeusserung ist der *Aktionsstoffwechsel* des Nerven. Neben erhöhtem Sauerstoffverbrauch und verstärkter Kohlensäurebildung treten bei der Erregung grössere Mengen von Milchsäure und Ammoniak auf. Die auffallendste Erscheinung des Aktionsstoffwechsels ist aber die äusserst rasche Bildung von Azetylcholin in den meisten peripheren Nervenfasern. Azetylcholin spielt als chemischer Mittler bei der Erregungsübertragung (Dale [10], Lœwi und Mitarbeiter [11]) und als Aktionssubstanz bei der Erregungsbildung (Lissak [12], von Muralt [9], [13], Brecht und Corsten [14]) eine wichtige Rolle. Diese Bildung von Azetylcholin bei der Erregung erfolgt so rasch, dass man annehmen musste. Azetylcholin liege schon weitgehend vorgebildet im Nerven vor in einer «gebundenen», physiologisch inaktiven Form, aus der es bei der Erregung leicht freigesetzt würde.

Es wurde also vermutet, dass Azetylcholin im *Ruhestoffwechsel* des zentralen und peripheren Nerven schon sehr weitgehend aufgebaut werden könne. Als möglicher Energielieferant für diese Reaktionen kam in erster Linie Glukose in Betracht, die bei den Stoffwechselvorgängen des aktiven Muskels als Energielieferant eine grosse Rolle spielt.

Tatsächlich geht aus einer Grosszahl von verschiedensten Versuchen mit Gewissheit hervor, dass die Bildung von Azetylcholin im Nervengewebe eng mit dem Kohlehydratabbau verknüpft ist. Sehr schön hat dieses McIntosh [7, 8] gezeigt, der am Halsganglion der Katze keine Bildung von Azetylcholin und einen Wegfall der Reizübertragung feststellte, sobald in der Durchströmungsflüssigkeit die Glukose fehlte.

Der Einfluss von Glukose auf die Azetylcholinbildung in Gehirnschnitten, wie auch die Wirkung von Kalium und seines Antagonisten Calcium sind von Quastel und seinen Mitarbeitern [2, 3, 4]

untersucht worden. Sie fanden eine kräftige Zunahme des Azetylcholingehaltes bei Gegenwart von Glukose oder Brenztraubensäure, keine messbare Steigerung hingegen beim Fehlen derselben.

E. und E. Stedman haben eine fermentative Azetylcholin-Synthese durch Gehirnschnitte in unphysiologischen Medien, wie Aether und Chloroform, nachgewiesen [5, 6]. Zur Aufklärung des physiologischen Bildungsmechanismus des Azetylcholins wird diesen Versuchen wohl eine untergeordnete Bedeutung zukommen, solange die Isolierung des synthetisierenden Fermentes (oder deren Mehrzahl) noch aussteht.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist die Prüfung der Frage, ob Azetylcholin im peripheren Nerven nicht nur freigesetzt, sondern auch im aeroben Stoffwechsel aufgebaut werden kann. Nach den Untersuchungen von Mann, Tennebaum und Quastel [15] an Gehirnschnitten ist es wahrscheinlich, dass gebundenes Azetylcholin eine Verbindung von freiem Azetylcholin mit seinem synthetisierenden Ferment ist und deshalb nur in Zellen vorkommen kann, die selbst Azetylcholin synthetisieren. Bevor die Versuche mit peripheren Nerven begonnen werden konnten, wurden Versuche mit Gehirngewebe als Modellsystem unternommen. Die mit Gehirngewebe ausgearbeiteten Methoden und Untersuchungen wurden auf das Nervengewebe übertragen. Es wurde die Bildung von Azetylcholin im aeroben Stoffwechsel mit und ohne Glukose gemessen. Die Bedeutung der Sauerstoffatmung für den Stoffwechsel des Gehirns, gemessen durch Vergiftung mit Blausäure in verschiedenen Konzentrationen, wurde festgestellt. Entsprechende Vergiftungen des Stoffwechsels des Nerven wurden nicht durchgeführt, da dieser so gering ist, dass mit den zur Verfügung stehenden Apparaten derart kleine Unterschiede im Gaswechsel mit genügender Exaktheit nicht festgestellt werden könnten. Im Verlauf der Untersuchungen am Nerven wies aber eine charakteristische Empfindlichkeitssteigerung der Blutegel gegenüber dem Einfluss von Azetylcholin darauf hin, dass Aneurin in den Nervenextrakten in grösseren Mengen vorlag. Diese sensibilisierende Wirkung des Aneurins am Blutegelpräparat ist von Minz [16], Brücke und Sarkander [17] und von Muralt [13] beschrieben worden. Es wurde daher zur Abrundung der Untersuchungen mit einer eigens dazu ausgebauten Methode der Aneuringehalt in den Nervenextrakten vor und nach Inkubation quantitativ festgestellt.

III. Methodisches

A. Messung des Stoffwechsels an der Warburg-Apparatur.

1. Die Entwicklung der Methode.

Das Prinzip, Gasreaktionen durch manometrische Beobachtungen messend zu verfolgen, ist so alt wie die Gasanalyse selbst.

Ein Differentialmanometer, das nach Konstruktion und Dimensionen den in der Physiologie gebrauchten ähnlich ist, beschrieb E. Warburg im Jahre 1900 [18, 19]. E. Warburg benutzte dieses Manometer, um die Geschwindigkeit der Ozonisierung zu messen. Barcrofts Differentialmanometer [20] unterscheidet sich von E. Warburgs Manometer durch zwei Hahnen, mit deren Hilfe Versuchs- und Kompensationsgefäss jederzeit mit der äusseren Atmosphäre verbunden werden können.

Im allgemeinen genügen für physiologische Zwecke einfache Manometer. Ein brauchbares Modell ist das von Haldane und Barcroft im Jahre 1902 konstruierte [21]«Blutgasmanometer», das eine Vorrichtung besitzt, um das Gasvolumen während der Gasentwicklung konstant zu halten. Manometrische Stoffwechselversuche hat schon Th. de Saussure ausgeführt. Diese, wie alle älteren manometrischen Stoffwechselversuche, krankten an dem Uebelstand, dass man die Kohlensäure, um Manometerausschläge zu erhalten, durch Alkali absorbieren musste. Die Folge war, dass die Versuchsbedingungen unphysiologisch, die Reaktionsbedingungen alkalisch wurden. Auf Vorgänge wie die Kohlensäureassimilation war das Verfahren, da man in kohlensäurefreiem Raum arbeitete, nicht anwendbar.

Die hier bestehenden Schwierigkeiten wurden durch ein Verfahren überwunden, das O. Warburg im Jahre 1919 beschrieb [22]. Es beruht auf der Tatsache, dass Kohlensäure in Wasser leichter löslich ist als Sauerstoff. Bringt man eine Zelle, die ebensoviel Kohlensäure bildet, als sie Sauerstoff verbraucht, in ein geschlossenes Gefäss, so ändert sich der Gasdruck nicht, da sich Gasverbrauch und Gasbildung die Waage halten. Lässt man aber das

Flüssigkeitsvolumen wachsen, bis es beträchtlich im Vergleich zum Volumen des Gasraums geworden ist, so wird der Sauerstoff vorwiegend aus dem Gasraum verbraucht, während die entwickelte Kohlensäure zur Hauptsache in der Flüssigkeit gelöst bleibt. Dann ist mit der Atmung eine Aenderung des Gasdruckes verbunden, aus der Sauerstoffverbrauch und Kohlensäurebildung berechnet werden können. Nach dem gleichen Prinzip wird die Kohlensäureassimilation neben der Atmung, die Gärung neben der Atmung, die Buttersäuregärung neben Milchsäuregärung manometrisch gemessen [23].

2. Einfache Manometer: Prinzip der Methode [24].

Bei konstantem Volumen und konstanter Temperatur wird die auftretende Aenderung des Gasdruckes gemessen. Mit Hilfe der Gasgesetze werden aus den Drucken die entstandenen oder verschwundenen Gasmengen berechnet.

Das Druckverfahren ist chemisch unspezifisch. Daher bedarf es, solange die chemische Natur der bei der Reaktion entstehenden und verschwindenden Stoffe nicht bekannt ist, stets der Ergänzung durch die chemische Analyse.

3. Apparatur.

Das benutzte Manometermodell ist das in Abb. 1 wiedergegebene Manometer.

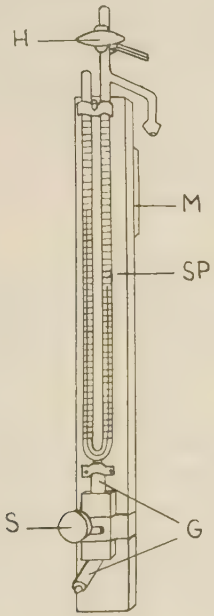


Abb. 1.

Abb. 2.

Die vor einem Spiegel (Sp) sich befindende U-förmige, mit einer Millimetereinteilung versehene Kapillare kommuniziert mit einem unten verschlossenen Gummischlauch (G). Der Durchmesser der Kapillare beträgt etwa 1 mm. Mittels der Schraube S lässt sich die Sperrflüssigkeit in der Manometerkapillare verschieben, wodurch das Volumen des Versuchsraumes konstant gehalten werden kann. Als Sperrflüssigkeit dient die Brodie'sche Flüssigkeit. Sie enthält 23 g Na Cl und 5 g Natriumcholeinicum in 500 ml Wasser, wozu noch einige Tropfen einer konzentrierten Thymollösung bis zum deutlichen Geruch nach Thymol zugegeben werden. Eine Säule von 10'000 mm der Brodie'schen Flüssigkeit ist bei Zimmertemperatur gleich dem Normaldruck von 760 mm Hg. Durch den Hahn H kann das Versuchsgefäss jederzeit mit der äusseren Atmosphäre verbunden werden. Mit Hilfe einer Messingtasche M wird das Manometer in die Schüttelvorrichtung am Thermostaten eingesetzt.

Abb. 2 zeigt die für die vorliegenden Untersuchungen benutzte Gefässform. Die Gefässe werden durch Schliffe mit den Manometern verbunden und durch kräftige Spiralfedern an diese angepresst. Zu jedem der 12 Gefässe gehört ein eigenes Manometer. Eine durch einen Elektromotor betriebene Schüttelvorrichtung am Thermostaten ermöglicht das Schütteln der Reaktionsgefässe mit einer Geschwindigkeit von mindestens 100 Schwingungen pro Minute. Zur Ablesung der Manometerausschläge ist eine Unterbrechung der Bewegung nötig, was durch ein Umlegen des Treibriemens von der Triebrolle auf eine benachbarte Laufrolle geschieht. Die Temperatur des Thermostaten wird durch einen Thermoregulator (Kontaktthermometer) auf $37° \pm 0{,}1°$ konstant gehalten. In die Schüttelvorrichtung können alle 12 Manometer eingesetzt werden.

4. Eichung der Gefässe.

Sie geschieht durch Ausmessen der Volumina mit reinem Quecksilber. Die Gefässe müssen mit Chromschwefelsäure gereinigt und getrocknet, die Schliffe dürfen nicht gefettet sein. Die Reaktionsgefässe werden mit Hg gefüllt und mit einem Ruck an das trockene Manometer angepresst, wobei sich die Kapillare mindestens bis zur Verzweigstelle mit Hg füllen muss. Hierbei treten hauptsächlich zwei Schwierigkeiten auf: 1. Der kleine Schliffstopfen des Anhanges wird durch das Hg herausgedrückt; 2. zwischen Glaswand und Quecksilber bleiben einige Luftblasen hängen.

Zur Behebung wird ein festsitzender Schlauch von etwa 2,5 cm Länge über den Stopfen und seinen Hals gestülpt und oben mit einem Schraubenquetschhahn zugeklemmt. Die Luftblasen aus dem Reaktionsgefäss lassen sich leicht mit einer Glaskapillare entfernen.

Ist die Manometerkapillare bis zur Verzweigstelle mit Hg gefüllt, so geschieht die weitere Füllung derselben von unten her in die fast waagrecht gehaltene Kapillare vermittels eines kurzen Schlauches und eines kleinen Trichters. Durch Neigen des Manometers wird das Hg durch den Zweiweghahn hinauslaufen gelassen, bis der Meniskus die Nullmarke (= 18) genau erreicht hat; Reaktionsgefäss und Manometerkapillare vom Hahn bis zur Nullmarke sind somit vollständig mit Hg gefüllt. Nach Sammlung des eingeschlossenen Hg in einem sauberen Glastrog kommt dieses in einem Wägeglas zur Wägung. Die so vermittelten Volumina, wobei das spezifische Gewicht des Quecksilbers bei 18 ° zu 13,55 angenommen wird, lassen sich leicht mit einer maximalen Abweichung von 0,05 % reproduzieren.

Die bei unseren Reaktionsgefässen gemessenen Volumina liegen zwischen 14'040 und 17'560 mm^3. Gefässe, bei denen ein Auswägen mit Hg Schwierigkeiten macht, werden auf manometrischem Wege geeicht [24].

5. Material.

Bei den vorliegenden Versuchen wurde mit Gewebebrei gearbeitet. Seine Zubereitung und die gewählten Suspensionsflüssigkeiten werden in den Abschnitten IV und V beschrieben.

Oft muss aber mit Gewebeschnitten gearbeitet werden, wobei die Schnittdicke eine ausschlaggebende Rolle spielt. Lässt man die Dicke der Schnitte fortgesetzt abnehmen, so nimmt mit der Länge des Diffusionsweges auch der untätige Gewebsanteil ab und verschwindet schliesslich. Die Schnittdicke, bei der dies eintritt, bezeichnet O. Warburg als die «Grenzschnittdicke», eine Grösse, die die obere Grenze der Schnittdicke angibt, über die nicht hinausgegangen werden darf, sollen die Messungen quantitativ verwertbar sein.

Warburg [25] hat unter vereinfachenden Voraussetzungen die Berechnung der Grenzschnittdicke für den Fall der Sauerstoffatmung durchgeführt und die Formel abgeleitet:

$$d = \sqrt{8c\,\frac{D}{A}}$$

Für Flächenschnitte, wo d die Grenzschnittdicke, c die Konzentration des Sauerstoffs in der Lösung, D die Diffusionskonstante für Sauerstoff und A der Sauerstoffverbrauch des Gewebes ist.

Nach Krogh diffundieren bei 38 ° durch einen Gewebsschnitt von 1 cm^2 pro Minute $1{,}4 \cdot 10^{-5}$ cm^3 O_2 (0 °, 760 mm Hg), wenn das Gefälle eine Atmosphäre pro Zentimeter beträgt. Setzt man diesen

Wert für D in die Gleichung ein, so ist c in Atmosphären auszudrücken und A in

$$\frac{\text{cm}^3 \text{ veratmeten } O_2}{\text{cm}^3 \text{ Gewebe} \cdot \text{Minuten}}.$$

A ist verschieden, je nach der Gewebeart. Für Lebergewebe ist der von Barcroft und Shore gefundene Höchstwert $5 \cdot 10^{-2}$. Setzt man diesen Wert für A in die Gleichung ein, so ergibt sich für d, wenn c eine Atmosphäre ist, 0,47 mm.

6. Berechnung des Gaswechsels (H. A. Krebs [24]).

a) Die «Gefässkonstante».

Es liegt ein teilweise mit Flüssigkeit gefülltes Gefäss, das durch ein U-förmiges Flüssigkeitsmanometer verschlossen ist, vor. In dem Gefäss entsteht ein Gas; das Volumen des Gefässes wird durch die Schraube S (Abb. 1) konstant gehalten. Die Aufgabe besteht nun darin, aus den bei konstantem Volumen und konstanter Temperatur auftretendem Druck h die Menge der entstandenen oder verschwundenen Gase zu berechnen.

Es sei:

v_g das Volumen des Gasraumes im Versuchsgefäss (einschliesslich der Manometerkapillare bis zur Nullmarke) in Kubikmillimetern;
v_f das Volumen der eingefüllten Flüssigkeit;
T die absolute Versuchstemperatur;
α der Bunsensche Absorptionskoeffizient des entstehenden oder verschwindenden Gases;
P_0 der Normaldruck in Millimetern Brodiescher Flüssigkeit (= 10'000 mm);
P der zufällige Anfangsdruck zu Beginn des Versuches;
h die am Manometer während des Versuches beobachtete Druckänderung in Millimetern.

Die bei dem Anfangsdruck P und der Versuchstemperatur T im Gasraum vorhandene Gasmenge (in Kubikmillimetern) ist gleich v_g. Auf den Normaldruck (10'000 mm) und die Normaltemperatur (273 ° absolute Temperatur) reduziert ist diese Gasmenge

$$\frac{P}{P_o} \cdot \frac{273}{T} \cdot v_g.$$

Die im Gasraum am Ende des Versuches, wenn der Druck P um h zugenommen hat, also $P + h$ beträgt, vorhandene Gasmenge ist (unter Normalbedingungen) in Kubikmillimetern

$$\frac{P+h}{P_o} \cdot \frac{273}{T} \cdot v_g.$$

Dann ist die Zunahme an Gas im Gasraum, wenn der Druck von P auf $P + h$ gestiegen ist

$$\frac{P+h}{P_o} \cdot \frac{273}{T} \cdot v_g - \frac{P}{P_o} \cdot \frac{273}{T} \cdot v_g = \frac{h}{P_o} \cdot \frac{273}{T} \cdot v_g.$$

Gleichzeitig nimmt die Gasmenge, die in der Flüssigkeit gelöst ist, zu, und zwar nach dem Gesetz von Henri pro Kubikmillimeter Flüssigkeit und pro Millimeter Brodiescher Flüssigkeit um $\frac{\alpha}{P_o}$ mm³, demnach für v_f mm³ Flüssigkeit und h mm Brodie

$$\frac{h}{P_o} \cdot v_f \cdot \alpha.$$

Die Summe beider Zunahmen ist die insgesamt entstandene Gasmenge x (0 °, 760 mm Hg)

$$x = h \cdot \left[\frac{v_g \frac{273}{T} + v_f \alpha}{P_o} \right] \qquad \text{(I)}$$

x ist also proportional h und unabhängig vom Anfangsdruck P. Jeder Millimeter Druckänderung zeigt — unabhängig vom Gesamtdruck — das Entstehen oder Verschwinden der gleichen Gasmenge an. Ist also h bekannt, so erhalten wir x durch Multiplikation von h mit dem in der Klammer stehenden Ausdruck, den Warburg als «Gefässkonstante» K bezeichnet. Je nach der chemischen Natur des entstehenden Gases, dessen Partialdruck-Aenderung h ausdrückt, ist die Gefässkonstante verschieden, weil die Absorptionskoeffizienten für die verschiedenen Gase verschieden sind. Auf Grund von Angaben von Hastings und Sendroy [26] ist in Serum und Ringerlösung bei 38 ° $\alpha CO_2 = 0{,}54$ und $\alpha O_2 = 0{,}024$.

Man unterscheidet die Gefässkonstanten, indem man ihnen die Symbole der Gase als Indices anfügt und schreibt:

$$X_{O_2} = h_{O_2} \cdot K_{O_2}$$
$$X_{CO_2} = h_{CO_2} \cdot K_{CO_2}$$

Die Gefässkonstanten sind von der Dimension einer Fläche, und zwar von der Grösse Quadratmillimeter, wenn die Drucke in Millimetern und die Volumina in Kubikmillimetern ausgedrückt sind. Ihr Vorzeichen ist immer positiv. Das Vorzeichen von h ändert sich, je nachdem ein Gas entsteht oder verschwindet. Im ersten Fall wird h positiv (und damit auch x), im zweiten wird h (und x) negativ. Das Verschwinden eines Gases wird also stets durch das negative, das Entstehen eines solchen durch das positive Vorzeichen ausgedrückt. Je kleiner die Gefässkonstante K ist, desto empfindlicher wird die Methode. K ist bei den verwendeten Gefässen 1—1,4, was

bedeutet, dass ein Manometerausschlag von 1 mm das Entstehen oder Verschwinden von 1—1,4 mm³ Gas anzeigt.

Der Gaswechsel kann nach Gleichung (I) ohne weiteres für den Fall berechnet werden, dass sich in dem Reaktionsgefäss der Partialdruck nur eines Gases ändert, also beispielsweise bei der Atmungsmessung, wenn das Reaktionsgefäss zur Adsorption der Atmungskohlensäure einen Einsatz mit Kalilauge enthält.

b) Berechnung des Gaswechsels bei gleichzeitiger Veränderung des Partialdruckes zweier Gase.

In vielen Fällen entstehen oder verschwinden im Stoffwechsel gleichzeitig mehrere Gase, beispielsweise Sauerstoff und Kohlensäure (Atmung, Kohlensäureassimilation). Dann ist die beobachtete Druckänderung h gleich der Summe der Partialdruckänderungen der verschiedenen Gase, z. B. im Falle der Atmung

$$h = h_{O_2} + h_{CO_2}.$$

Die für die Berechnung notwendigen Gleichungen gewinnt Warburg durch eine Methode, die auf der Tatsache beruht, dass Kohlensäure in Wasser leichter löslich ist als Sauerstoff: Man füllt in zwei Gefässe von gleichem Gesamtvolumen gleiche Zellmengen, aber verschiedene Flüssigkeitsmengen. Dann sind x_{O_2} und x_{CO_2} in beiden Gefässen gleich, verschieden sind aber die Gefässkonstanten und damit auch die Druckänderungen in den beiden Gefässen. Unterscheidet man für die beiden Gefässe mit grosser und kleiner Flüssigkeitsmenge die Gefässkonstanten und Druckänderungen durch grosse und kleine Buchstaben, so ergeben sich folgende Gleichungen:

$$x_{O_2} = \frac{h \cdot k_{CO_2} - H \cdot K_{CO_2}}{\frac{k_{CO_2}}{k_{O_2}} - \frac{K_{CO_2}}{K_{O_2}}}, \qquad x_{CO_2} = \frac{h \cdot h_{O_2} - H \cdot K_{O_2}}{\frac{k_{O_2}}{k_{CO_2}} - \frac{K_{O_2}}{K_{CO_2}}}$$

IIa IIb

Für den Fall, dass das Verhältnis $\frac{X_{co_2}}{X_{o_2}} = \beta$ bekannt ist, kann die Messung und Berechnung vereinfacht werden.

Zur Berechnung stehen folgende vier Gleichungen zur Verfügung:

$$\begin{aligned} X_{o_2} &= h_{o_2} \cdot k_{o_2} \\ X_{co_2} &= h_{co_2} \cdot k_{co_2} \\ X_{co_2} &= \beta X_{o_2} \\ h &= h_{o_2} + h_{co} \end{aligned}$$

Nach X_{o_2} aufgelöst, ergibt sich

$$X_{o_2} = h \frac{k_{co_2} \cdot h_{o_2}}{k_{co_2} + \beta k_{o_2}}$$

Und nach X_{co_2} aufgelöst, ergibt sich

$$X_{co_2} = h \frac{k_{co_2} \cdot k_{o_2}}{\frac{k_{co_2}}{\beta} + k_{o_2}}$$

Für die Messung von X_{o_2} und X_{co_2} ist also — wenn β bekannt ist — nur ein Gefäss erforderlich. Die Genauigkeit der Messung wird, wie leicht einzusehen ist, umso grösser, je mehr $-\frac{k_{co_2}}{k_{o_2}}$ von β verschieden ist.

c) Berechnung und Bestimmung der Retention.

Nach den in den vorangehenden Abschnitten abgeleiteten Formeln kann der Zellstoffwechsel im allgemeinen noch nicht berechnet werden, wenn die Versuchsflüssigkeit Kohlensäure chemisch bindet, wie beispielsweise Blutserum.

Die Retention spielte in den ausgeführten Versuchen keine Rolle. Eine ausführliche Darstellung für deren Bestimmung und Berechnung gibt H. A. Krebs [24].

7. Ausführung der Versuche.

Da die Atmung und die Glykolyse zu messen waren, mussten mehrere Ansätze parallel ausgeführt werden. Der Sauerstoffverbrauch wurde ermittelt durch Absorption der gebildeten Kohlensäure mittels 0,5 ml 30prozentiger Kalilauge, welche in den eingeschmolzenen mittleren Raum der Reaktionsgefässe gegeben wurden (Berechnung nach Formel I). Das Totalvolumen betrug 3,5 ml, die Lösung war phosphatgepuffert. In einem zweiten Ansatz wurde nach 1, 2 und 4 h durch Zukippen von 0,5 ml HCl 1 *n* aus dem Seitenarm die gebildete Kohlensäure, die zum Teil durch den Phosphatpuffer chemisch gebunden war, vollständig ausgetrieben und nach Formel (I) berechnet.

In einem weiteren Ansatz ist der Stoffwechsel in bicarbonatgepufferter Lösung verfolgt worden. Es wurde die Differenz zwischen verbrauchtem Sauerstoff und in Freiheit gesetzter Kohlensäure gemessen. Jedes Molekül einer entstehenden fixen Säure, die sich in allen von Warburg [27] bei Gegenwart von Glukose untersuchten Fällen als Milchsäure erwies, setzt eine äquivalente Menge CO_2 frei. Das Totalvolumen betrug 3,0 ml.

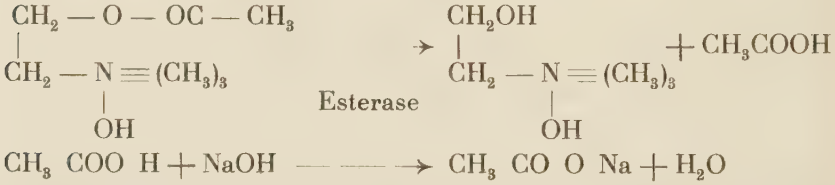
Durch Vergleich dieser drei Messungen liessen sich der Sauerstoffverbrauch, die Kohlensäurebildung und die Bildung von Milchsäure bestimmen.

B. Messung von Azetylcholin.

1. Spaltung durch Cholinesterase.

a) Die Methode.

Stedman und Easson [28] haben im Jahre 1932 für das Ferment, das neben Azetylcholin auch Butyrylcholin und in geringem Umfange auch O-Azetylaneurin [29], [30], [31] hydrolysiert, den Namen «Cholinesterase» vorgeschlagen. Sie haben auch die erste Methode zur Bestimmung von Azetylcholin ausgearbeitet, die auf der Spaltung von Azetylcholin durch Cholinesterase beruht. Diese kommt in besonders hoher Konzentration in Pferdeblutserum vor. Eine wässerige Lösung von Azetylcholinchlorid wird mit Bromthymolblau versetzt und mit 0,025 m NaOH auf schwachen Blauton gebracht. Hierauf wird zur Lösung Pferdeserum zugefügt und die Lösung, wenn nötig, wieder auf den alten Farbton gebracht. Durch konstantes Zufliessenlassen der Lauge wird die Lösung immer auf dem gleichen Farbton gehalten. Nach zirka einer Stunde ist die Titration beendet und der Gesamtverbrauch an Lauge entspricht der aus dem Azetylcholin in Freiheit gesetzten Menge Essigsäure. Der Vorgang ist, chemisch dargestellt, der folgende:



Für Reihenuntersuchungen und weil Serum eine Eigenfarbe besitzt, ist diese Methode ungeeignet. R. Ammon [32] hat darum auf derselben Grundlage eine andere Methode eingeführt, die in der Folge weiter ausgebaut wurde und bei vielen Autoren Anwendung fand.

Sie beruht darauf, dass die Essigsäure in einer mit Bicarbonat gepufferten Lösung durch Esterasewirkung abgespalten wird und aus der Lösung eine äquivalente Menge CO_2 in Freiheit setzt. Die Kohlensäure wird in der Warburg-Apparatur manometrisch gemessen.

Diese Methode lässt sich sowohl zur Messung von Azetylcholin als auch zur Bestimmung der Konzentration (oder Aktivität) der Cholinesterase verwenden.

Im ersten Falle wird nach dem Temperaturausgleich aus dem Seitenarm ein Ueberschuss an Cholinesterase (am besten Pferdeblutserum) zugekippt und die Kohlensäurefreisetzung, die bald ein Maximum erreicht, gemessen.

Will man die Konzentration an Cholinesterase bestimmen, so lässt man nach dem Temperaturausgleich aus dem Seitenarm eine grössere Menge gelöstes Azetylcholin (etwa 3 mg) zufliessen und misst die in der Zeiteinheit 1 Stunde freigesetzte Menge CO_2 in Kubikmillimeter: Nachmansohnscher Quotient. Diese CO_2-Entwicklung (und damit auch die Hydrolysenwirkung der Esterase) bleibt während mehreren Stunden konstant, bis das Azetylcholin weitgehend gespalten oder der Bicarbonatpuffer der Lösung merklich aufgebraucht ist.

Es ist dies die klassische Methode zur Messung der Cholinesterase-Konzentration oder -Aktivität in den verschiedenen Organgeweben und Körperflüssigkeiten.

b) Ausführung der Bestimmung.

Als Unterlage diente die von Marnay und Nachmansohn [33] beschriebene Versuchsanordnung. Es wurde eine Azetylcholin-Stammlösung (Azetylcholin Roche) hergestellt, so dass nach der Zugabe des Bicarbonatpuffers die Lösung genau 1 % war. Daraus wurden mit Ringerlösung nach Marnay und Nachmansohn in Verdünnungsreihen die nötigen Verdünnungen hergestellt.

Froschringerlösung: 6,25 g NaCl, 0,2 g $CaCl_2$, 0,15 g KCl } pro 1 l.

100 ml davon ergeben mit 10 ml einer 1,1prozentigen $NaHCO_3$-Lösung die fertige Pufferlösung. Ein Gasgemisch von 95 % O_2 + 5 % CO_2 diente zur Konstanthaltung des p_H auf 7,4. Die Lösungen wurden daran gesättigt und der Gasraum in den Reaktionsgefässen damit angefüllt. Zu jeder Versuchsserie wurden ein oder mehrere Thermobarometer, die genau gleich behandelt waren, jedoch kein Azetylcholin enthielten, beigegeben.

c) Resultate.

Abb. 3 stellt den Druckverlauf bei der Kohlensäurefreisetzung aus Azetylcholin einer Versuchsreihe mit drei verschiedenen Ansätzen dar.

Ansätze:

0 : Thermobarometer.
3,0 ml Ringerlösung Anhang 0,1 ml Serum
1 : 0,1 mg Azetylcholin in 3 ml Ringer » 0,1 » »
2 : 0,2 » » » 3 » » » 0,1 » »
3 : 0,3 » » » 3 » » » 0,1 » »

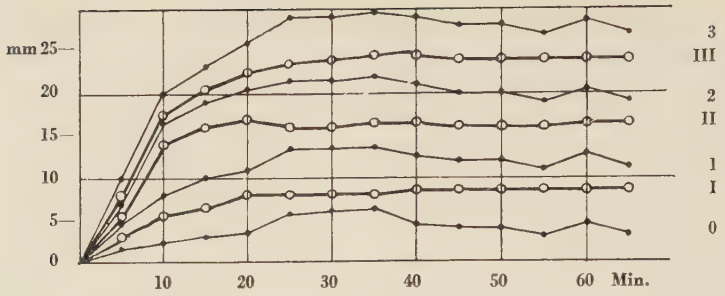


Abb. 3.

Durch Korrektur der Kurven 1, 2, 3 nach der Kurve des Thermobarometers ergeben sich die Kurven I, II, III. Die Berechnung der Volumina aus den abgelesenen Drucken ergibt:

für 1 : 12,9 mm³ oder 0,104 mg Azetylcholin
2 : 24,6 » » 0,199 » »
3 : 34,6 » » 0,280 » »

Die Berechnung der theoretischen CO_2-Freisetzung durch die aus dem Azetylcholin abgespaltene Essigsäure geschieht folgendermassen: Aus 1 Mol. Azetylcholin (Mol.-Gew. 181,5) wird durch Hydrolyse 1 Mol. Essigsäure abgespalten, welche ihrerseits 1 Mol. CO_2 aus dem Puffer freisetzt.

Also: 181'500 mg Azetylcholin entwickeln 22'412'000 mm³ CO_2 und

$$1 \text{ mg } \frac{22'412'000}{181'500} = 123{,}5 \text{ mm}^3 \text{ } CO_2.$$

Die Drucke lassen sich auf 0,2 mm genau ablesen, und da die Gefässkonstanten etwa bei 1,3 liegen, können 0,1 mg Azetylcholin mit einer Genauigkeit von höchstens ± 2 % bestimmt werden.

0,1 mg Azetylcholin bedeuten somit die praktisch untere Grenze der feststellbaren Azetylcholinmenge.

Im Laufe der Untersuchungen ergab sich, dass die zu messenden Mengen von Azetylcholin einige Zehnerpotenzen kleiner waren, so dass nach anderen, empfindlicheren Messverfahren gesucht werden musste.

2. Weitere Nachweismethoden.

Eine Abscheidung von Azetylcholin aus wässeriger Lösung gelingt mit Reineckesalz. Dieses Reagens fällt jedoch auch Cholin und eine Reihe anderer Substanzen, weshalb das Verfahren von Beattie [34], welcher das ausgefällte Reineckat in Azetonlösung kolorimetrisch bestimmt, keine zuverlässigen Werte liefert. Bessere

Resultate erhielten Kapfhammer und Mitarbeiter [35], wenn die Fällung erst nach erfolgter Enteiweissung durch Trichloressigsäure oder Metaphosphorsäure geschah. Sie führten das abgeschiedene Reineckat in Chloroaureat über und bestimmten dieses gravimetrisch.

Die titrimetrische Bestimmung des Azetylcholins kann auch ohne Cholinesterase erfolgen. Azetylcholin wird durch Lauge sehr schnell und vollständig hydrolysiert. Geschieht die Hydrolyse in einem abgemessenen Volumen von *n*/10 oder *n*/100 Natronlauge, so lässt sich die überschüssige Lauge ohne weiteres zurücktitrieren.

Ungleich viel feinere Nachweismethoden für Azetylcholin beruhen in seiner hervorragenden, pharmakologisch spezifischen Wirkung auf biologische Testobjekte. Als solche dienen verschiedene parasympathisch innervierte Organe: das isolierte Froschherz [36, 37], der überlebende Dünndarm [38], der Rückenmuskel des Blutegels [39, 40], das isolierte Froschrectum [41] und die isolierte Froschlunge [14, 14a], sowie die Senkung des Blutdruckes der Katze [40, 41], an welchen die zu prüfenden azetylcholinhaltigen Extrakte unter Benützung einer Standardlösung von bekanntem Azetylcholingehalt quantitativ ausgewertet werden. Die Anwesenheit anderer Substanzen, welche die Testobjekte in gleichem oder entgegengesetztem Sinne beeinflussen, beeinträchtigt die Prüfung meistens nicht, da die spezifische Wirkung des Azetylcholins bereits in Verdünnungen in Erscheinung tritt, bei welchen sich der Einfluss von Begleitstoffen noch nicht störend bemerkbar macht. Durch Vergleich der Wirkungen auf die einzelnen Organe und der Verringerung des Blutdruckes an der Katze lassen sich die verschiedenen Derivate des Cholins, wie auch andere blutdrucksenkende Stoffe, sehr schön differenzieren [44].

3. Nachweis am Blutegelpräparat.

Der Rückenmuskel des Blutegels, der cholinergisch innerviert ist, reagiert auf Konzentrationen von Azetylcholin bis zu $5 \cdot 10^{-10}$ (1 : 5 Milliarden) durch Kontraktion. Die Kontraktionen werden auf einem Kymographion registriert.

Die Technik des Blutegelpräparates ist von Fühner [39] entdeckt und seither mehrfach verbessert worden [40, 42, 43, 44, 45]. Für die vorliegenden Versuche wurde die Technik der genauen Zeiteinteilung [41, 45] gewählt.

Da die im Hallerianum Bern von Prof. A. v. Muralt ausgearbeitete Technik, wie sie in der Literatur beschrieben ist [13], zur Anwendung kam, wird hier nur der Gang der Messungen kurz dargestellt.

Am Morgen des Versuchstages werden zwei Blutegel präpariert, so dass vier Stücke des Rückenmuskels entstehen. Diese werden senkrecht (frei hängend) am Schreibarm eines leicht beweglichen isotonischen Hebels befestigt und unten an einer hakenförmig gebogenen Kapillare festgebunden. Das Präparat wird anschliessend während genau zwei Stunden in einer bicarbonatfreien Ringerlösung, die Eserin 1 : 100'000 enthält, sensibilisiert. Durch die gebogene Kapillare wird reiner Sauerstoff eingeleitet. Dann wird während zwei Minuten (nach der Stoppuhr) zur Sensibilisierung der Blutegel und Standardisierung der folgenden Kontraktionen eine starke Azetylcholinlösung gegeben, z. B. 10^{-7} (bei einem Gefässvolumen von 5 cm^3 wirken 0,5 γ Azetylcholin). Darauf wird 1½ Stunde mit Ringer-Eserinlösung gespült. 3½ Stunden nach der Präparation ist der Blutegel bereit zu den Versuchen, kann alle 30 Minuten benützt werden und gibt eine gleichmässig abfallende Empfindlichkeitskurve. Es werden abwechselnd Lösungen bekannten (z. B. 10^{-8}) und unbekannten (Nervenextrakte) Gehaltes an Azetylcholin zugegeben. Die Dauer der Einwirkung ist immer genau zwei Minuten. Das Kymographion wird nach der Stoppuhr abgestellt. Ein Beispiel der so erhaltenen Kurven zeigt Abb. 4.

Abb. 4.

Die Auswertung der Kurven geschieht nach dem von v. Muralt [13] angegebenen Verfahren. Da bei biochemischen Untersuchungen Schwankungen in den Reaktionsabläufen nicht zu vermeiden sind, muss eine grosse Anzahl von Versuchen durchgeführt werden. Es wurden im Laufe der vorliegenden Untersuchungen über 1500 Messungen von Azetylcholin am Blutegelpräparat ausgeführt.

C. Messung von Aneurin mit der Thiochrommethode.

1. Die Methode.

1935 hat Kuhn [47] einen stark blau fluoreszierenden Körper aus Hefe isoliert, welchen er «Thiochrom» nannte. Die Bildung dieses fluoreszierenden Thiochroms aus Aneurin durch Oxydation mit Kaliumferricyanid in alkalischer Lösung benützte zuerst Jansen

[48, 49] zu einer quantitativen Bestimmung des Vitamins B_1, die mit der biologischen Prüfung eine befriedigende Uebereinstimmung gab. Um von allen subjektiven Einflüssen unbhängig zu sein, nahm Jansen die Fluoreszenzmessung in dem von Cohen [50] beschriebenen Fluorometer vor. Diese Methode wurde unter Beibehaltung des Prinzips der Thiochrombildung für die Bestimmung des Aneurins in verschiedenen Stoffen und physiologischen Flüssigkeiten von einigen Autoren abgeändert. W. Karrer [51, 52] arbeitete die Methode für die Bestimmung in Harn und Blut um. Er adsorbiert das Vitamin an Frankonit und misst die Fluoreszenz nach der Oxydation nicht im Fluorometer, sondern im Vergleich mit Standardlösungen unter der Hanauer Analysenquarzlampe. Ritsert [53] änderte das Verfahren von Karrer, indem er die Thiochrombildung direkt im Harn und nicht über das Adsorbat durchführt. Otto und Rühmekorb [54], wie hauptsächlich auch Harris und Wang [55] haben die Aneurinbestimmung mit dem Thiochromverfahren weitgehend ausgebaut und die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von verschiedenen Einflüssen, die auch für die übrigen Ausführungen der Thiochrommethode von Bedeutung sind, untersucht.

Zu erwähnen ist noch das Verfahren von Kinnersley und Peters [56, 57, 58], das sich auf eine rote Farbreaktion gründet, die beim Versetzen von Aneurin in alkalischem Milieu mit Diazobenzolsulfosäure eintritt (Formaldehyd-Azo-Test).

2. Ausführung der Bestimmung.

Die endgültig angewandte Methode der Bestimmung von Aneurin und Cocarboxylase im Nerven wurde durch Kombination der Arbeiten von Harris und Wang [59, 55] und derjenigen von K. Ritsert [53, 60, 61, 62, 63] entwickelt. Da bei der Ausführung der Bestimmung peinlich genaues Einhalten der Reaktionsbedingungen unerlässlich ist und zudem eine apparative Neuheit vorgeschlagen wird, soll die Methode in extenso dargestellt werden.

a) Prinzip der Methode.

In einem ersten Ansatz «unknown» wird die unbekannte Menge Aneurin aus dem Nerven zu Thiochrom oxydiert. (Die von Harris und Wang eingeführten Bezeichnungen der Ansätze als «unknown», «blank» und «control» sollen auch hier zur Anwendung kommen.) Die bekannte, grössere (!) Menge reines Aneurin des Ansatzes «control» wird genau parallel auch zu Thiochrom oxydiert und die Lösung des entstandenen Thiochroms bekannter Konzen-

tration aus einer Mikrobürette unter der Fluoreszenzlampe zum Ansatz «blank», der mit Ausnahme der Zugabe von Oxydationsmittel genau gleich behandelt wird wie «unknown», zulaufen gelassen, bis die gleiche Fluoreszenzintensität wie in «unknown» erreicht ist. Durch dieses Verfahren sollen Fehler, die durch das Auftreten von Nebenfluoreszenzen entstehen, möglichst vermieden werden. Diese Nebenfluoreszenzen lassen sich trotz Waschungen vor und nach der Oxydation nicht völlig entfernen und treten bei allen Verfahren der Thiochrommethode störend in Erscheinung. Durch die parallele Oxydation von reinem Aneurin und solchem im Gewebe werden auch die Fehler einer mangelhaften Oxydation oder einer oxydativen Zerstörung des gebildeten Thiochroms, sowie Fehler, die durch eine zeitlich abhängige Zerstörung der Thiochroms (Ultraviolettlicht, Tageslicht!) auftreten, vermieden.

b) Extraktion und Verdauung.

Die Messung des Aneurins erfolgt vor und nach verschieden langer Inkubation in der Warburg-Apparatur. Die Zubereitung der Nerven geschieht nach der in Kapitel V beschriebenen Weise. Zur Bestimmung des Totalaneuringehaltes (freies Aneurin + solches aus der Cocarboxylase) werden 600 mg peripherer Nerv in 12 ml mit HCl angesäuerter Lösung zehn Minuten lang im Wasserbad unter Schütteln auf 100° erhitzt. Mit einem Azetatpuffer wird das p_H auf genau 4 eingestellt (Indicator Bromcresolgrün), das Volumen auf 15 ml ergänzt, 0,2 g Papayotin 1 : 200 (Siegfried) und 0,2 g Diastase (Merck) zugefügt, mit zwei Tropfen Toluol versetzt und 18 Stunden bei 40° im Thermostat stehen gelassen. Diastase Merck enthält neben der Diastase und Proteasen auch eine für die Aufspaltung von Cocarboxylase genügende Menge Phosphatase. Die quantitativen Beziehungen bei der enzymatischen Spaltung von Cocarboxylase durch Diastase Merck sind von K. Ritsert [62] einwandfrei festgestellt worden. Papayotin unterstützt nach Harris und Wang [55] hervorragend die Wirkung der Diastase, da diese in tierischem Gewebe oft sehr stark gehemmt wird. Diastase und Papayotin haben beide ihr p_H-Optimum bei p_H 4.

c) Erstes Auswaschen mit Isobutanol.

Nach der 18stündigen Inkubation werden die Nervenreste in einer Winkelzentrifuge scharf abzentrifugiert und je 5,0 ml Lösung in zwei graduierte Schütteltrichter einpipettiert. (Abb. 5). Die Anwendung solcher Schütteltrichter hat sich bei diesen Untersuchungen als äusserst vorteilhaft erwiesen, wird doch erst durch sie die

Genauigkeit der Methode soweit erhöht, dass eine zuverlässige Messung des Aneurins möglich ist. Die Graduierung von 0—20 ml ist in 1/10 ml eingeteilt. Die Höhe der einzelnen zylindrischen Schütteltrichter ist 23 cm, der Totalinhalt beträgt etwa 28 ml. Oben erfolgt der Verschluss durch einen eingeschliffenen Glasstopfen, unten befindet sich ein ganz leicht eingefetteter, einfach durchbohrter Abflusshahn. Die Schütteltrichter und dazugehörenden Stopfen sind fortlaufend numeriert.

Abb. 5.

Zur ersten Entfernung von störenden Nebenfluoreszenzen sowie von Trübungsstoffen wurden die beiden Extrakte (unknown und blank) mit je 5 ml an Wasser gesättigten Isobutanol versetzt und 1 Minute lang geschüttelt. (Das Isobutanol, wie auch alle weiteren organischen Lösungsmittel sind auf Abwesenheit von Fluoreszenzen zu prüfen und wenn nötig, durch Destillation sorgfältig zu reinigen.)

Die Trennung der Schichten erfolgt meist leicht und vollständig. Sollte sie nicht oder nur sehr schwer eintreten, so wird in graduierten Zentrifugengläsern scharf zentrifugiert.

Das Volumen der wässerigen Lösung, das durch Aufnahme von wenig Isobutanol etwas grösser geworden ist, wird genau notiert: V_1. Die Isobutanolschicht wird darauf von oben sorgfältig und vollständig abgesaugt, wobei von der wässerigen Schicht stets auch ein kleiner Anteil mit abgesaugt werden muss. Das überbleibende

Volumen wird abgelesen und notiert: v_1. Es empfiehlt sich, bei Reihenuntersuchungen alle Lösungen auf das gleiche Volumen abzusaugen, z. B. auf 5,0 ml.

Ein dritter Ansatz («control»), der anstatt des Nervenextraktes eine genau bekannte Menge Aneurinhydrochlorid (von der Firma Hoffmann-La Roche) bei p_H 4 enthält (in 5,0 ml Lösung z. B. 4 γ hat sich für diese Untersuchungen als günstig erwiesen) wird genau gleich behandelt. Die Waschung mit Isobutanol bezweckt, eine eventuelle geringe Verteilung des Aneurins auf die beiden Phasen Wasser und Isobutanol herbeizuführen, die nach dem Verteilungssatz bei allen Ansätzen prozentual die gleiche sein muss. Die entsprechenden zu notierenden Volumina seien: Vc_1 und v_{c_1}.

d) Oxydation zu Thiochrom.

Zu den drei Lösungen werden je 3,0 ml Methanol zugegeben, worauf zur «unknown»-Lösung 3—5 Tropfen einer zweiprozentigen $K_3Fe(CN)_6$-Lösung (je nach Aneuringehalt) und zur «control»-Lösung acht Tropfen beigefügt werden. In alle drei Schütteltrichter werden nun je 2,0 ml einer 25prozentigen NaOH-Lösung zugegeben und die Lösungen durch einmaliges Umkippen homogenisiert. Nach einer Minute Stehen werden zu den Lösungen je 10,0 ml Isobutanol gegeben und die Reaktionsgefässe zwei Minuten lang (Stoppuhr!) kräftig geschüttelt. Man lässt, nachdem sich die Schichten getrennt haben, die unteren wässerigen Schichten durch den Hahn ablaufen. Die gelben Lösungen sollen nach dem Schütteln nicht vollständig entfärbt sein.

e) Waschen mit H_2O.

5,0 ml H_2O werden in jedes Reaktionsgefäss gegeben und diese wieder eine Minute lang geschüttelt. Nach der Trennung der Schichten werden die Volumina der überstehenden Isobutanolextrakte notiert. «Unknown» und «blank»: V, «control»: V_c. (Alle entsprechenden Volumablesungen der Ansätze «unknown» und «blank» waren bei den ausgeführten Versuchen gleich.) Nach Ablaufenlassen der wässerigen Schichten und einiger ml des Isobutanolanteils (zum Ausspülen von Hahn und Ablaufrohr) lässt man eine bestimmte, bei «unknown» und «blank» gleich grosse Menge der Isobutanollösung in zwei trockene Reagensgläser fliessen: Vol. v. (Bei den ausgeführten Versuchen meist 8 ml.) Zur Klärung der Lösungen werden je 2,0 ml Aethanol zugefügt.

Von der «control»-Lösung lässt man auf dieselbe Art 6 oder 9 ml (je nach der Menge des erwarteten Aneurins) in ein trockenes Reagensglas fliessen: Vol. v_c. 4,0 ml Aethanol werden zugegeben und mit Isobutanol das Volumen auf 20 ml ergänzt $= V_T$.

f) Vergleich der Fluoreszenz.

Er soll direkt anschliessend an die ausgeführten Operationen erfolgen. Die Reagensgläser müssen vorher auf Abwesenheit von Fluoreszenz im Glase geprüft sein. Die Augen sollen vor Ausführung der Titration 15 Minuten lang in völlig verdunkeltem Zimmer an die Dunkelheit gewöhnt werden. (Das Maximum der Dunkeladaptation wird erst nach 40 Minuten erreicht.) Der Vergleich erfolgt am besten unter einer Philips «Philoralampe» oder einer Hanauer Analysen-Quarzlampe. Beide müssen mit einem Woodschen Filter versehen sein. Das Absorptionsmaximum von Thiochrom liegt bei 368/369 m μ. Es wird durch Licht von dieser Wellenlänge schnell zerstört: darum nicht länger als jeweils drei Sekunden unter der Lampe betrachten! Man schaut am besten von oben in die schräg gehaltenen Gläser. Die «control»-Lösung wird tropfenweise aus einer Mikrobürette zur «blank»-Lösung zugetropft. Ist die gleiche Fluoreszenzintensität fast erreicht, so wird der «unknown»-Lösung gleichviel Isobutanol zugegeben, wie zur «blank»-Lösung aus der Bürette zugeflossen war. Die Lage der Gläser soll von Zeit zu Zeit gewechselt werden (ungleiche Beleuchtung). Ist die Titration beendet, so sollen zwei Tropfen Ueberschuss eine deutlich stärkere Fluoreszenz ergeben. Das verbrauchte Volumen sei x ml.

g) Differentiation von Cocarboxylase und Aneurin.

Die Behandlung des Nervenextraktes geschieht genau wie bei *b* angegeben ist, doch fällt die Inkubation mit Diastase und Papayotin weg. Der durch Oxydation entstehende Thiochrompyrophosphorsäureester fluoresziert genau gleich wie Thiochrom, doch ist er in Isobutanol völlig unlöslich. Die bei der gleichen Behandlung entstehende Fluoreszenz rührt also nur vom freien Aneurin her. Aus der Differenz der beiden Bestimmungen lässt sich der Gehalt an Cocarboxylase berechnen.

h) Berechnung.

Sie erfolgt nach der Formel:

$$X \cdot \frac{Y \cdot v_{c_1} \cdot v_c}{V_{c_1} \cdot V_c \cdot V_T} \cdot \frac{V_1 \cdot V}{v_1 \cdot v \cdot a} = \gamma/g \text{ Aneurin.}$$

X = Menge der gebrauchten Titrierflüssigkeit;
Y = Totalmenge des zu Thiochrom oxydierten Aneurins (Titrierflüssigkeit) in γ.
V_{c_1} = Volumen der wässerigen Aneurinlösung (control) nach der Waschung mit Isobutanol;

v_{c_1} = Volumen der wässerigen Aneurinlösung (control) nach Absaugen der Isobutanolschicht;

Vc = Volumen der Isobutanollösung des Thiochroms (control) nach der Oxydation;

v_c = Volumen des davon für die Titrierflüssigkeit verwendeten Anteils;

V_T = Endvolumen der Titrierflüssigkeit;

V_1 = Volumen des wässerigen Extraktes nach der Waschung mit Isobutanol;

v_1 = Volumen des wässerigen Extraktes nach Absaugen der Isobutanolschicht;

V = Volumen des Isobutanolextraktes nach Oxydation und Waschung mit H_2O;

v = Volumen des davon zur Titration gelangenden Anteils;

a = Menge der extrahierten Substanz im Ansatz «unknown».

3. Genauigkeit der Methode.

Es wurden die in den Nerven bei den angegebenen Ansätzen zu erwartenden Mengen reines Aneurin genau nach der beschriebenen Methode bestimmt.

Sie betrugen in den einzelnen Ansätzen:

1. 0,05 γ gefunden wurden:	0,054 γ	= 108 %
2. 0,10 γ	0,102 γ	= 102 %
3. 0,20 γ	0,216 γ	= 108 %
4. 0,40 γ	0,384 γ	= 96 %
5. 0,80 γ	0,70 γ	= 88 %

Bei 1. betrug die Menge an Thiochrom in den zur Titration gelangenden 10 ml Lösung theoretisch 0,028 γ, in der üblichen Konzentrationsangabe: 0,003 γ/ml, welche mit einer Genauigkeit von $\pm$ 10 % wieder gefunden werden.

Die Erfassungsgrenze und Objektivität dieser Methode lässt sich noch sehr stark steigern durch Messung der Fluoreszenzintensität vermittels einer Photozelle. Dieses Verfahren der quantitativen Messung von ganz geringen Fluoreszenzintensitäten wird gegenwärtig im Hallerianum Bern von R. Stämpfli ausgearbeitet.

VI. Untersuchungen am Gehirn

A. Experimentelles.

1. Präparierung des Gehirns.

Als Versuchstier wurde die Laboratoriumsratte gewählt. Die Tiere stammten aus der eigenen Zucht des physiologischen Institutes (Abteilung Prof. I. Abelin) und waren völlig normal. Es wurden nur ausgewachsene Exemplare verwendet. Die Ratten wurden durch Nackenschlag getötet. Um die postmortalen Veränderungen des Gehirns möglichst zu vermeiden, wurde dieses sofort nach eingetretenem Tode in schneller, behutsamer Arbeit herauspräpariert. Jeder Bluterguss in die Gehirnkapsel war streng zu vermeiden, da geronnenes Blut sehr schwierig aus den Gehirnwindungen zu entfernen ist. Nach Entfernung der behaarten Haut über dem Schädeldach wurde dieses von der kaudalen Seite her mit einer Papageienschnabelschere sorgfältig herausgebrochen, bis das Gehirn völlig freilag, welches sich leicht unversehrt herausheben liess. Die dura mater sowie alle Blutgefässe wurden soweit als möglich mit feinen Pinzetten und durch Tupfen mit Filterpapier entfernt. Die so präparierten Gehirne wogen in der Regel 800—1000 mg.

Um gleiche Anteile an grauer und weisser Gehirnsubstanz in den Reaktionsgefässen der Manometer zu erhalten, wurde das Gehirn durch einen Längsschnitt in zwei gleiche Hälften getrennt und durch Querschnitte aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde mit Zusatz von Glukose, die andere ohne behandelt. Nachdem sich die Schnitte einige Minuten in Lockelösung erholt hatten, wurden sie schnell auf Filterpapier getrocknet und auf der Torsionswaage auf 1 mg genau gewogen. Dann wurden sie im Mörser ohne Sand während 10 Sekunden zerrieben, mit der entsprechenden Menge Lockelösung (auf 100 mg 2,0 ml Lösung) versetzt und während genau fünf Minuten weiter zerrieben. So bildete sich eine leicht pipettierbare, milchige Suspension von Gehirnfetzen, von welcher in jedes Reaktionsgefäss 2,0 ml (= 100 mg Gewebe) gebracht wurden. In den Anhang des Gefässes kamen 0,5 ml einer frischen Eserinsulfatlösung 1 : 4000 in

Lockelösung und das Volumen wurde mit Lockelösung auf 3,0 ml ergänzt. Die Endkonzentration an Glukose war 0,01 m, diejenige an Eserinsulfat 1 : 24'000. Ein zu jeder Serie beigegebenes und genau gleich behandeltes Reaktionsgefäss ohne Gewebe diente als Thermobarometer. Jeder Ansatz wurde doppelt ausgeführt.

2. Lösungen und Ansätze.

Als isotonische Lösung diente die Lockelösung nach Mann et al. [4] (NaCl: 0,13 m, KCl: 0,004 m, $CaCl_2$: 0,002 m, Na-Phosphatpuffer p_H 7,4: 0,03 m oder $NaHCO_3$: 0,025 m). Die Phosphatpufferlösung muss zuletzt zugegeben werden, ansonst beim Eingiessen der $CaCl_2$-Lösung unlösliches Calciumphosphat ausfällt.

Der Gasraum in den Reaktionsgefässen wurde über der bicarbonatgepufferten Lösung zur Konstanthaltung des p_H auf 7,4 mit einem Gasgemisch von 95 % O_2 + 5 % CO_2, über der phosphatgepufferten mit O_2 allein gefüllt. Alle Lösungen waren vor der Verwendung während ½ bis 1 Stunde mit dem entsprechenden Gasgemisch gesättigt worden. Nach dem Temperaturausgleich wurden die Reaktionsgefässe angepresst, bis die Schliffe festsassen, der Meniskus der Manometerflüssigkeit auf die Nullmarke gebracht und die Eserinlösung aus dem Seitenarm zugekippt.

B. Ergebnisse.

Die zeitliche Abhängigkeit der Bildung von Azetylcholin im Gehirngewebe (100 mg) mit und ohne Glukose zeigt Abb. 6. Die Verteilung der gebildeten Azetylcholin-Mengen auf freies und gebundenes Azetylcholin und die zeitliche Verschiebung des Mengenverhältnisses dieser beiden Formen gehen aus Tabelle 1 hervor.

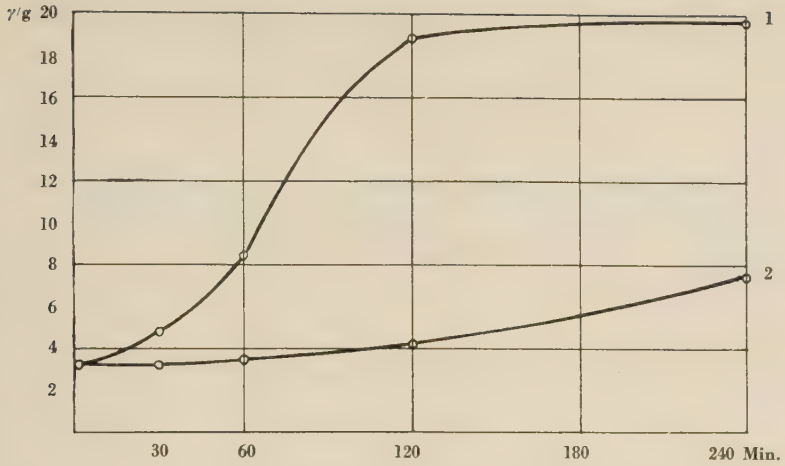


Abb. 6. *Bildung von Azetylcholin:* (Total-Azetylcholin) in γ pro Gramm Gehirngewebe (Feuchtgewicht).

Kurve 1: Atmung von 100 mg Gehirngewebe in 3,0 ml Lockelösung + Glukose 0,01 m (Mittelwerte aus 6—31 Einzelbestimmungen). — Kurve 2: Atmung von 100 mg Gehirngewebe in 3,0 ml Lockelösung ohne Glukose (Mittelwerte aus 4—14 Einzelbestimmungen).

Tabelle 1.

Verhältnis von freiem zu gebundenem Azetylcholin.

Min.	freies A. Ch.	geb. A. Ch.	Total A. Ch.	freies / geb.	Min.	freies A. Ch.	geb. A. Ch.	Total A. Ch.	freies / geb.
	Vor der Inkubation				0	0,84	2,10	2,94	0,40
	Mit Glukose 0,01 m					Ohne Glukose			
30	2,1	2,6	4,7	0,82	30	1,0	1,9	2,9	0,52
60	4,1	4,4	8,5	0,93	60	1,5	1,8	3,3	0,83
120	13,4	5,3	18,7	2,25	120	2,2	1,7	3,9	1,3
240	14,7	4,8	19,5	3,1	240	5,0	2,4	7,4	2,1

Die zeitliche Abhängigkeit der Volumänderung des Gasraumes über 100 mg atmendem Gehirnbrei mit und ohne Glukose zeigen Abb. 7 und 8. Die zeitlichen Beziehungen zwischen Sauerstoffverbrauch, Glykolyse und dem nach Abzug der Extrakohlensäure berechneten respiratorischen Quotienten gehen aus Tabelle 2 hervor. Das Verhältnis der Glykolyse zur Atmung G/R ist bei Glukosezusatz grösser und nimmt in beiden Fällen mit der Zeit ab.

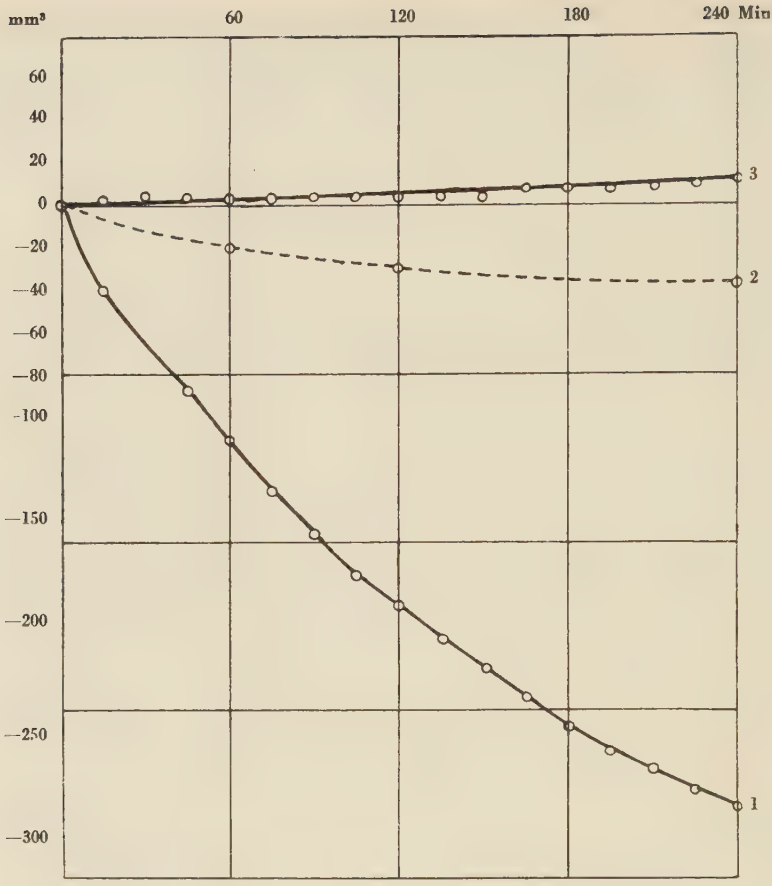


Abb. 7.

Abb. 7 und 8. *Volumänderung bei Atmung von 100 mg Gehirngewebe* in 3,0 ml Lockelösung. 7: mit Glukose 0,01 m, 8: ohne Glukose (Mittelwerte aus 6—12 Bestimmungen). 1 und 1' : Sauerstoffverbrauch. Die entstehende Kohlensäure wurde mit 0,5 ml 30prozentiger KOH absorbiert. 2 und 2' : Die in der Lockephosphatlösung gebundene Kohlensäure wurde nach 1, 2 und 4 Stunden mit 1 *n* HCl ausgetrieben. Die aufgetragenen Werte sind die nach dem Zukippen der Säure abgelesenen Volumina, vermindert um das Volumen der bis zum Versuchsbeginn gebildeten Kohlensäure. Diese betrug bei 100 mg Gehirngewebe in Lockelösung in der Regel mit Glukose 11 mm³, ohne Glukose 20 mm³. 3 und 3' : Atmung in Locke-Bicarbonatlösung, ohne Absorption von CO_2. Die Kurven geben die Differenz zwischen verbrauchtem Sauerstoff und gebildeten Säuren (CO_2 und Milchsäure) an.

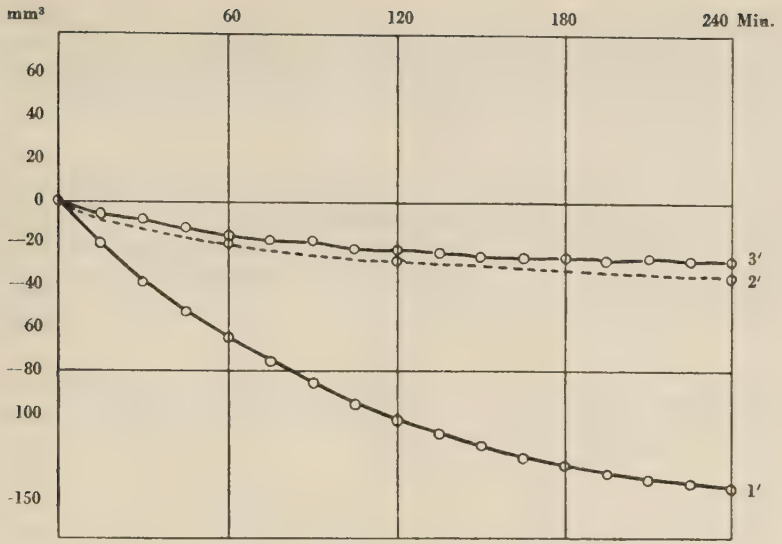


Abb. 8.

Tabelle 2.

Glykolyse und respiratorischer Quotient des Atmungsanteiles.

Zeit	Glukose	O_2-Verbr.	CO_2-Bildung	M. S.-Bildung	G/R	RQ
1 Stunde	+	— 112	91	25	0,28	0,81
	–	— 64	45	4	0,09	0,70
2 Stunden	+	— 191	159	36	0,23	0,83
	–	— 103	75	6	0,08	0,72
3 Stunden	+	— 248	212	43	0,20	0,85
	–	— 125	91	6,5	0,071	0,73
4 Stunden	+	— 286	248	48	0,19	0,87
	–	— 137	101	7	0,069	0,74

Vergiftung des aeroben Stoffwechsels mit Blausäure: Die Wirkung der Blausäure in Konzentrationen von *n*/10'000 und *n*/1000 auf den zeitlichen Verlauf der Atmung und Glykolyse von 100 mg Gehirngewebe mit und ohne Glukose ist aus den Abb. 9 und 10 ersichtlich.

Auffallend ist in Abb. 9 die Steigerung von Atmung und Glykolyse durch HCN *n*/10'000 und die Anregung der Glykolyse neben einer starken Hemmung der Atmung durch HCN *n*/*1000*. Fehlt Glukose (Abb. 10), so wirkt Blausäure in beiden Konzentrationen hemmend, sowohl auf die Glykolyse wie auf die Atmung. Bei HCN

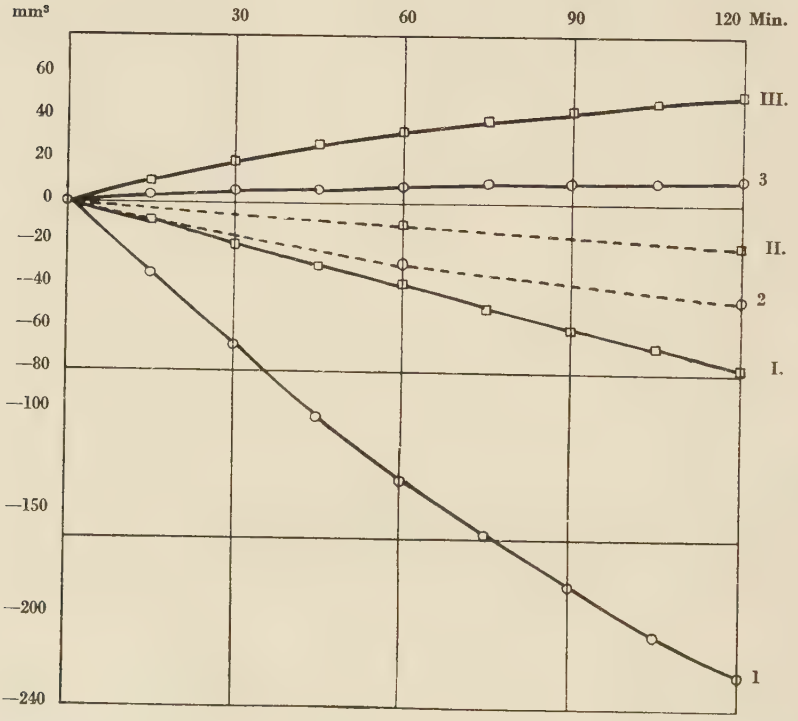


Abb. 9.

Abb. 9 und 10: *Volumänderungen bei Atmung* von 100 mg Gehirngewebe in 3,0 ml Lockelösung, mit HCN *n*/10'000 — o —, mit HCN *n*/1000 — □ —. (Mittelwerte aus 4—6 Bestimmungen.) 9: mit Glukose 0,01 m, 10: ohne Glukose. Die Kurven wurden auf die nämliche Art erhalten wie die der Abb. 7 und 8. Die Blausäurelösung wurde nach dem Temperaturausgleich zugekippt oder unmittelbar vor dem Einsetzen der Gefässe zugefügt. In Abb. 9 sind die Werte nur über 2 Stunden angegeben.

n/1000 ist die starke Schädigung des aeroben Stoffwechsels ganz offensichtlich: neben einer sehr geringen Sauerstoffaufnahme findet eine entsprechend kleine Kohlensäurebildung statt und eine minimale Bildung von «Extrakohlensäure».

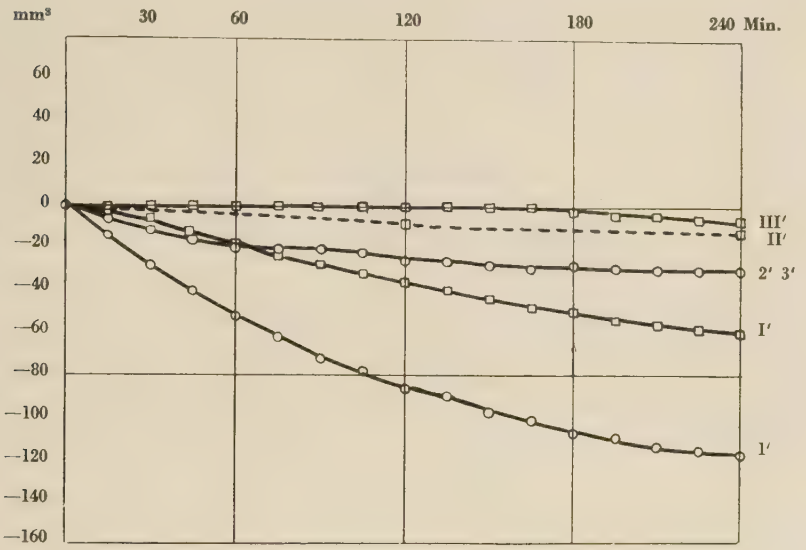


Abb. 10.

Die Tabellen 3 und 4 zeigen die zeitlichen Beziehungen zwischen Sauerstoffverbrauch, Glykolyse und dem nach Abzug der Extrakohlensäure berechneten respiratorischen Quotienten bei Vergiftungen mit Blausäure n/10'000 und n/1000. Das Verhältnis der Glykolyse zur Atmung ist bei Glukosezusatz grösser und nimmt regelmässig mit der Zeit ab. Es ist grösser mit Blausäure n/1000 als mit Blausäure n/10'000. Der respiratorische Quotient wird erstaunlich konstant auf einem relativ niedrigen Niveau gehalten. Er weist nur mit Blausäure n/1000 eine fallende Tendenz auf.

Tabelle 3.

Zusatz von *n*/10'000 HCN.

Zeit	Glukose	O_2-Verbr.	CO_2-Bildung	M. S.-Bildung	G/R	RQ
1 Stunde	+	— 134	107	36	0,33	0,80
	—	— 53	32	0	0	0,60
2 Stunden	+	— 225	179	57	0,32	0,80
	—	— 86,5	61	0	0	0,70
3 Stunden						
		— 107	77	0	0	0,71
4 Stunden						
	—	— 119	87	0	0	0,73

Tabelle 4.

Zusatz von *n*/1000 HCN.

Zeit	Glukose	O_2-Verbr.	CO_2-Bildung	M. S.-Bildung	G/R	RQ
1 Stunde	+	— 39	29	43	1,45	0,75
	-	- 18,5	15	5	0,33	0,81
2 Stunden	+	— 79	58	74	1,28	0,73
		- 37,5	30	7	0,23	0,80
3 Stunden						
		— 50	39	8	0,21	0,78
4 Stunden						
	—	- 60	46	9	0,20	0,77

V. Untersuchungen am peripheren Nerven

A. Experimentelles.

1. Gewinnung des Nervenmaterials.

Der N. ischiadicus der Ratte von seinem Austritt aus dem Rückenmark bis zur Fusswurzel wiegt durchschnittlich 60—80 mg. Seine Präparierung ist recht langwierig. Für grössere Reihenuntersuchungen eignet er sich seines geringen Gewichtes wegen nicht. Beim Meerschweinchen sind die Verhältnisse nicht viel besser, die Tiere aber bedeutend teurer. In Zusammenarbeit mit dem Tierspital konnten einige frisch getötete Hunde vollständig seziert werden. Da aber in Bern nur selten und ganz unregelmässig Hunde zur Tötung gelangen, musste anderweitig nach Nervenmaterial gesucht werden, das regelmässig in grösseren Mengen erhältlich war. Dieses wurde im Schlachthaus gefunden. Es standen Nerven von Rindern, Schafen und Schweinen zur Verfügung.

In histologischen Untersuchungen hat Herr Prof. Dr. Ziegler festgestellt, dass Rindernerven sehr reich an zähem Bindegewebe sind und sich nicht gut zu Stoffwechseluntersuchungen eignen. Besser liegen die Verhältnisse beim Schaf und Schwein. Herrn Prof. Ziegler sei an dieser Stelle für seine bereitwillige Hilfe bestens gedankt.

Da die Nerven der Schweine in eine lockere Fettschicht eingebettet liegen, sind sie bedeutend leichter zu gewinnen als beim Schaf. Sie sind auch weniger kompakt und etwas dicker als die entsprechenden Nerven des Schafes. So wurden in der Folge nur noch Nerven von Schweinen untersucht. Es kamen nur ganz oberflächlich verlaufende Nerven in Frage, da das Fleisch durch die Sektion nicht die geringste Einbusse an Verkaufswert erleiden durfte. Ein solcher Nerv ist der *nervus obturatorius*. Er tritt aus dem Plexus lumbalis aus, und sein Stück zwischen dem musculus psoas major und dem canalis obturatorius liegt unmittelbar unter der fascia pelvis, der dünnen Haut des Beckenbodens. Er kann leicht

aufgefunden werden, da er direkt neben der deutlich durchschimmernden arteria obturatoria verläuft. Da ein Schwein durchschnittlich 15 Minuten nach eingetretenem Tode fertig ausgeweidet und in zwei Hälften gespalten zur Sektion bereit hängt, ist auch das wichtige Problem der raschen Nervenentnahme gelöst.

So konnten regelmässig jeden Montag die Nerven einer grösseren Anzahl von Schweinen gewonnen werden. Die möglichst sauber herauspräparierten Stücke des N. obturatorius wogen zirka 150 mg. Sie wurden sofort in einem grossen Wägeglas mit eingeschliffenem Deckel, welches in einem breiten Dewar-Gefäss mit zerkleinertem Trockeneis allseitig umgeben war, eingefroren. In diesem tiefgekühlten Zustand liessen sich die Nerven eine Woche gut aufbewahren, wenn das verdampfte Trockeneis jeden Tag neu ersetzt wurde.

2. Präparierung der Nerven.

Die Gelbfärbung der Nerven, die als Zeichen einer Veränderung der Lipoide bei der Mazeration sehr leicht auftritt, lässt sich vermeiden, wenn die Nerven in tiefgefrorenem Zustande zerkleinert werden: sie bleiben schön weiss. Die Nervenstücke wurden auf einer Torsionswaage rasch, ohne aufzutauen, auf 1 mg genau gewogen und in einem vorgekühlten Mörser mit flüssiger Luft übergossen. Nach möglichst rascher und weitgehender Zerkleinerung mit einer Knochenzange wurden sie bei Gegenwart von Trockeneis ohne Sand zerrieben. Sobald die Temperatur 0° erreicht hatte, liess man die berechnete Menge der Suspensionsflüssigkeit zufliessen: zu 100 mg Nervengewebe 2,0 ml Lösung. Die Aufschlämmung wurde während genau 5 Minuten weiter zerrieben und dann während 10 Minuten durch eine bicarbonatgepufferte Lösung ein Gemisch von 95 % O_2 + 5 % CO_2, durch eine phosphatgepufferte reiner Sauerstoff durchgeleitet. Dieser Nervenbrei liess sich leicht pipettieren. In jedes Reaktionsgefäss kamen 100 mg Nervensubstanz, die Zusätze waren die gleichen wie bei den Untersuchungen am Gehirnbrei.

B. Ergebnisse.

Den Gehalt an Azetylcholin des peripheren Nerven nach 0, 1, 2 und 4 Stunden mit und ohne Glukose zeigt Abb. 11. Die Verteilung der gefundenen Azetylcholinmengen auf freies und gebundenes Azetylcholin und die zeitliche Verschiebung dieses Mengenverhältnisses geht aus Tabelle 5 hervor.

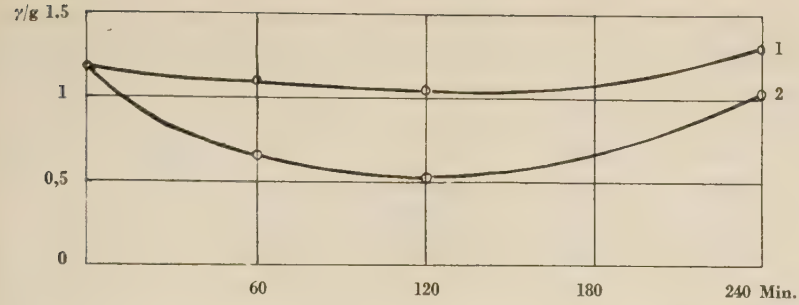


Abb. 11. Gehalt an Azetylcholin (Total-Azetylcholin) in γ pro Gramm peripheren Nerv (Feuchtgewicht). 1: Atmung von 100 mg Gehirngewebe in 3,0 ml Lockelösung + Glukose 0,01 m (Mittelwerte aus 12—45 Einzelbestimmungen). 2: Atmung von 100 mg peripheren Nerv in 3,0 ml Lockelösung ohne Glukose (Mittelwerte aus 12—14 Einzelbestimmungen).

Tabelle 5.

Verhältnis von freiem zu gebundenem Azetylcholin im peripheren Nerven.

Min.	freies A. Ch.	geb. A. Ch.	Total A. Ch.	freies / geb.	Min.	freies A. Ch.	geb. A. Ch.	Total A. Ch.	freies / geb.
	Vor der Inkubation				0	0,94	0,24	1,18	3,90
	Mit Glukose				Ohne Glukose				
60	0,45	0,59	1,04	0,76	60	0,43	0,23	0,66	1,90
120	0,39	0,61	1,00	0,64	120	0,34	0,20	0,54	1,70
240	0,20	1,03	1,23	0,20	240	0,43	0,59	1,02	0,73

Der Gehalt des peripheren Nerven an Aneurin wurde mit der Thiochrommethode bestimmt. Die gefundenen Werte an Aneurin und Cocarboxylase vor und nach Inkubation sind in der Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6.

Aneurin und Cocarboxylase im peripheren Nerven.

Minuten	Aneurin γ/g	Cocarboxylase γ/g	Total γ/g
0	0,26	0,13	0,39
120	0,47	0,01	0,48

Der Verlauf der Atmung von Nervengewebe in Locke-Bicarbonatlösung mit und ohne Glukose ist in Abb. 12 dargestellt.

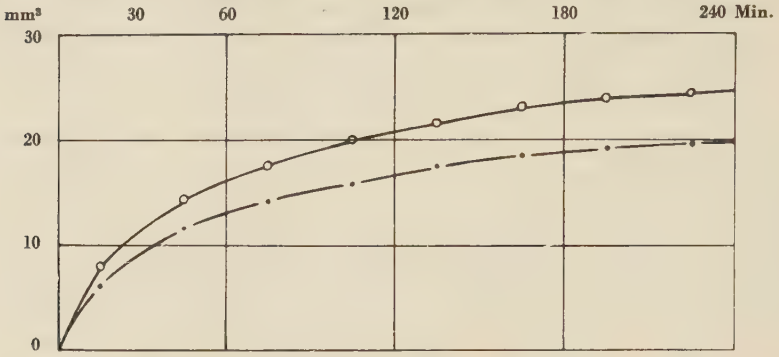


Abb. 12. Volumänderung bei Atmung von 100 mg Nervengewebe in 3,0 ml Locke-Bicarbonatlösung. —o— mit Glukose, —·— ohne Glukose (Mittelwerte aus 8 Bestimmungen). Die Kurven geben die Differenz zwischen verbrauchtem Sauerstoff und freigesetzter Kohlensäure an (Atmungskohlensäure + Kohlensäure aus dem Bicarbonat, ausgetrieben durch stärkere Säuren). Die während der Lagerung und Mazeration vom Nervengewebe aufgenommene Kohlensäure wird im Verlauf der Inkubation wieder abgegeben und bestimmt weitgehend den Verlauf der Kurven.

Die Atmungskohlensäure wurde durch Zukippen von Salzsäure zu einer phosphatgepufferten Lockelösung ermittelt. Vor der Inkubation wurde die vom Nervengewebe während der Lagerung und Mazeration gebundene Kohlensäure gemessen. Die erhaltenen Resultate zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7. **CO_2-Entwicklung.**

	Vor der Inkubation		19 mm³	
Minuten	Mit Glukose		Ohne Glukose	
		Nach Abzug von 19 mm³		Nach Abzug von 19 mm³
60	21,5	2,5	24,75	5,75
120	22,8	3,8	25,5	6,5
240	25,0	6,0	26,0	7,0

Der Sauerstoffverbrauch von Nervengewebe bei der Atmung während 4 Stunden mit und ohne Glukose ist in Abb. 13 dargestellt.

Die merkwürdige Tatsache, dass Zusatz von Glukose den Sauerstoffverbrauch stark herabsetzt, wird in der Besprechung der Ergebnisse behandelt.

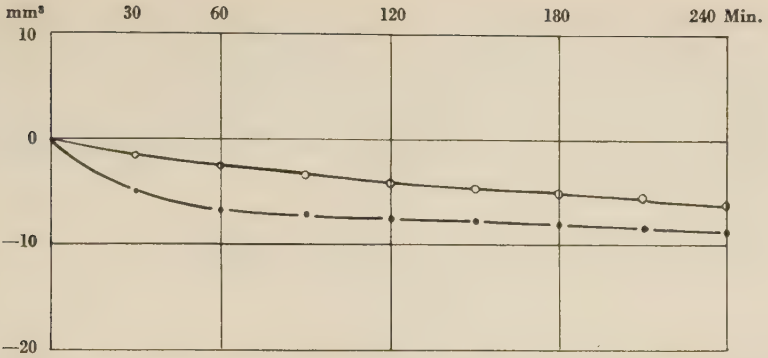


Abb. 13. Sauerstoffverbrauch bei Atmung von 100 mg Nervengewebe in 3,0 ml Lockelösung. Die entstehende Kohlensäure wurde mit 0,3 ml 30prozentiger KOH absorbiert (Mittelwerte aus 6 Bestimmungen). —o— mit Glukose, —·— ohne Glukose.

Den Verlauf von Sauerstoffverbrauch, Kohlensäureentwicklung und Bildung von «Extrakohlensäure» während 4 Stunden bei Gegenwart von Glukose zeigt Abb. 14, ohne Glukose Abb. 15.

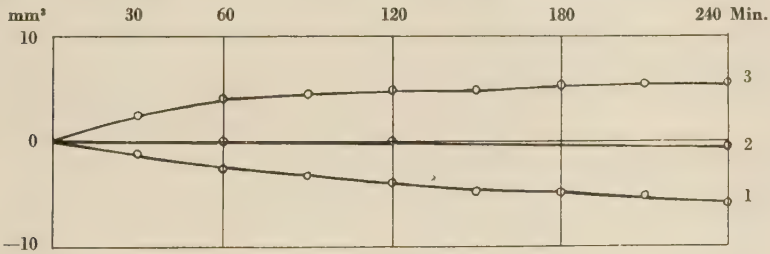


Abb. 14.

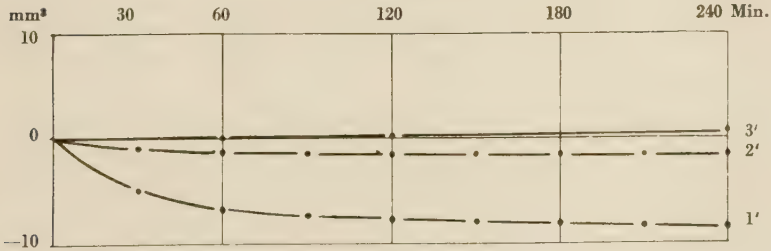


Abb. 15.

Abb. 14 und 15. Volumänderung bei Atmung von 100 mg Nervengewebe in 3,0 ml Lockelösung (Mittelwerte aus 6—8 Bestimmungen). 1 und 1' : Sauerstoffverbrauch. 2 und 2' : Kohlensäurebildung. Die aufgetragenen Werte sind die nach dem Zukippen von Salzsäure ermittelten Volumina, vermindert um das Volumen der bis zum Versuchsbeginn gebundenen Kohlensäure. Dieses betrug 19 mm^3. 3 und 3' : Atmung in Locke-Bicarbonatlösung. Die in Form einer Gleichgewichtseinstellung vom Nervengewebe abgegebene Kohlensäure wurde von den Kurven der Abb. 12 abgezogen.

Die zeitlichen Beziehungen zwischen Sauerstoffverbrauch, Glykolyse und dem nach Abzug der Extrakohlensäure berechneten respiratorischen Quotienten gehen aus Tabelle 8 hervor. Das Verhältnis der Glykolyse zur Atmung G/R ist bei Gegenwart von Glukose sehr hoch und nimmt mit der Zeit ab, während ohne Glukose G/R kleiner ist und langsam zunimmt.

Tabelle 8.

Glykolyse und respiratorischer Quotient des Atmungsanteils von Nervengewebe.

Nach	Glukose	O_2-Verbrauch	CO_2-Bildung	M. S.-Bildung	G/R	RQ
60 Minuten	+	— 2,6	2,5	4,0	1,60	0,96
	—	— 6,6	5,75	1,0	0,17	0,87
120 Minuten	+	— 4,1	3,8	5,0	1,32	0,93
	—	— 7,8	6,5	1,5	0,23	0,84
180 Minuten	+	— 5,3	4,9	5,6	1,14	0,925
	—	— 8,2	6,8	1,7	0,25	0,83
240 Minuten	+	— 6,5	6,0	6,0	1,00	0,92
	—	— 8,5	7,0	1,9	0,27	0,82

VI. Besprechung der Ergebnisse

A. Gehirn.

1. Synthese von Azetylcholin.

Mann und seine Mitarbeiter [4] haben unter physiologischen Bedingungen eine Bildung von Azetylcholin in Gehirnschnitten festgestellt und gemessen. Sie finden, dass sich in der Zelle ein Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Azetylcholin einstellt, so dass bei einer gewissen Konzentration an freiem Azetylcholin in der Zelle eine weitere Synthese nicht mehr stattfindet. Wird durch eine Erhöhung der Permeabilität der Zellwände (durch Kaliumwirkung) die Wegdiffusion des freien Azetylcholins erleichtert, so setzt der Aufbau von Azetylcholin wieder ein.

Die genannten Autoren konnten in zerriebenen Hirnschnitten bei Zusatz von Glukose keine Steigerung des Total-Azetylcholins durch Kaliumionen feststellen, wohl aber eine deutliche Verschiebung von der gebundenen zur freien Form bei Abwesenheit von Glukose. Da die Synthese an der Oberfläche eines Fermentes erfolgen soll, wird offenbar die Loslösung des Azetylcholins von dieser Oberfläche durch Kaliumionen gefördert.

Nach den vorliegenden Versuchen am Gehirnbrei steigt in Gegenwart von Glukose während den ersten 2 Stunden der Gehalt an Total-Azetylcholin stark an, um dann bis zur 4. Stunde nur noch unbedeutend zuzunehmen. Von der 2.—4. Stunde bleibt der Gehalt an gebundenem Azetylcholin konstant (nimmt eventuell leicht ab), und es erfolgt nur noch eine geringe Zunahme an freiem Azetylcholin. Das Verhältnis freies Azetylcholin/gebundenes Azetylcholin steigt von 0,4 bis zu 3,1 nach der 4. Stunde. Da bei den mitgeteilten Versuchen im Hinblick auf die nachfolgenden Untersuchungen an Nerven mit weitgehend zerkleinertem Material (Gehirnbrei) gearbeitet werden musste, stellt sich die Frage, ob die Befunde von Mann et al. in diesem Falle auch gültig sind. Die mitgeteilten Werte liegen etwas tiefer als die entsprechenden Mengen, die Mann et al.

erhielten, was mit der vorgenommenen weitgehenden Zerkleinerung des Gewebes zusammenhängen wird. Die Bildung von Azetylcholin in bicarbonatgepufferter Lösung gegenüber der phosphatgepufferten ist in den ausgeführten Versuchen nicht messbar verschieden, während Mann et al. in Bicarbonat eine erhöhte Bildung von Azetylcholin fanden. Versuche mit in flüssiger Luft eingefrorenen Gehirnschnitten, welche in Kohlensäure zerpulvert wurden, ergeben keine Differenz, weder in der Azetylcholin-Synthese noch im Stoffwechsel gegenüber dem nach der beschriebenen Weise zubereiteten Gehirnbrei.

Für die von der 2. zur 4. Stunde beobachtete starke Abnahme der Bildungsgeschwindigkeit von Azetylcholin lassen sich vorerst zwei Gründe anführen.

1. Zwischen gebundenem und freiem Azetylcholin besteht ein Gleichgewicht. Erreicht die Konzentration des freien Azetylcholins einen bestimmten Wert, so wird dieses Gleichgewicht offenbar so gestört, dass eine weitere Bildung nicht mehr möglich ist.

2. Die Azetylcholin-Synthese nimmt zusammen mit der allgemeinen Verringerung des Stoffwechsels ab, weil das Gewebe allmählich erschöpft ist. Offenbar hört sie aber auf, bevor der Stoffwechsel aussetzt (vgl. Abb. 7, Kurve 1).

Zwischen dem Sauerstoffverbrauch des Gewebes und der Bildung von Azetylcholin liegt keine unmittelbare Beziehung vor. Der Verlauf der Bildungskurven (Abb. 6) deckt sich nicht mit dem Verlauf der Atmung (Abb. 7, 8). Mit Glukose ist die Bildung von der 2. Stunde an fast gleich Null, während die Sauerstoffaufnahme unverändert weitergeht. Ohne Glukose dagegen ist die Bildung von Azetylcholin in den ersten 2 Stunden gering, ein Befund, der sich mit den Beobachtungen von Mann et al. völlig deckt, und nimmt nachher zu, während umgekehrt die Sauerstoffaufnahme gerade in den ersten 2 Stunden gross ist und nachher fast auf 0 absinkt. In der ersten Phase nimmt das gebundene Azetylcholin ab und das freie Azetylcholin nimmt um wenig grössere Beträge zu. Das Verhältnis von freiem zu gebundenem Azetylcholin vergrössert sich langsam. Von der 2. Stunde an erfolgt jedoch eine intensivere Bildung von Azetylcholin bei gleichzeitiger Zunahme des Gehaltes an freiem und gebundenem Azetylcholin. Es scheint ein neuer Bildungsmechanismus in Funktion zu treten, der imstande ist, Reserven aus dem Gehirn zur Synthese zu mobilisieren. Hiefür kommt Glykogen in Frage, das im Gehirn als Reserve eingelagert ist. Immerhin ist zu bedenken, dass nach Page [64] das Glykogen unter normalen Bedingungen im Gehirn immobilisiert ist und dass nach Geiger und Magnes [65] Glykogenolyse im Gehirnbrei nur sehr langsam oder

dann schnell erst auf Zusatz von Diastase erfolgt, die im Gehirn nicht vorkommt.

Wie Abb. 8 zeigt, sinkt der Sauerstoffverbrauch von der 2. bis 4. Stunde sehr stark ab. Die Bildung des Azetylcholins erfolgt in diesem Zeitpunkt ohne Sauerstoffaufnahme.

Demgegenüber findet im gleichen Zeitraum bei Anwesenheit von Glukose trotz fortlaufender Sauerstoffaufnahme keine Bildung von Azetylcholin mehr statt. Diese beiden Befunde sind nur erklärlich durch die Annahme eines dynamischen Gleichgewichtszustandes zwischen freiem und gebundenem Azetylcholin, welches mit dem von Mann vorgeschlagenen Gleichgewichtsschema in der Zelle gut zu vereinbaren ist, wenn an Stelle der Zellmembran die Oberfläche des synthetisierenden Fermentes gesetzt wird.

Den Bildungsmechanismus kann man sich etwa nach dem Schema auf Seite 54 vorstellen.

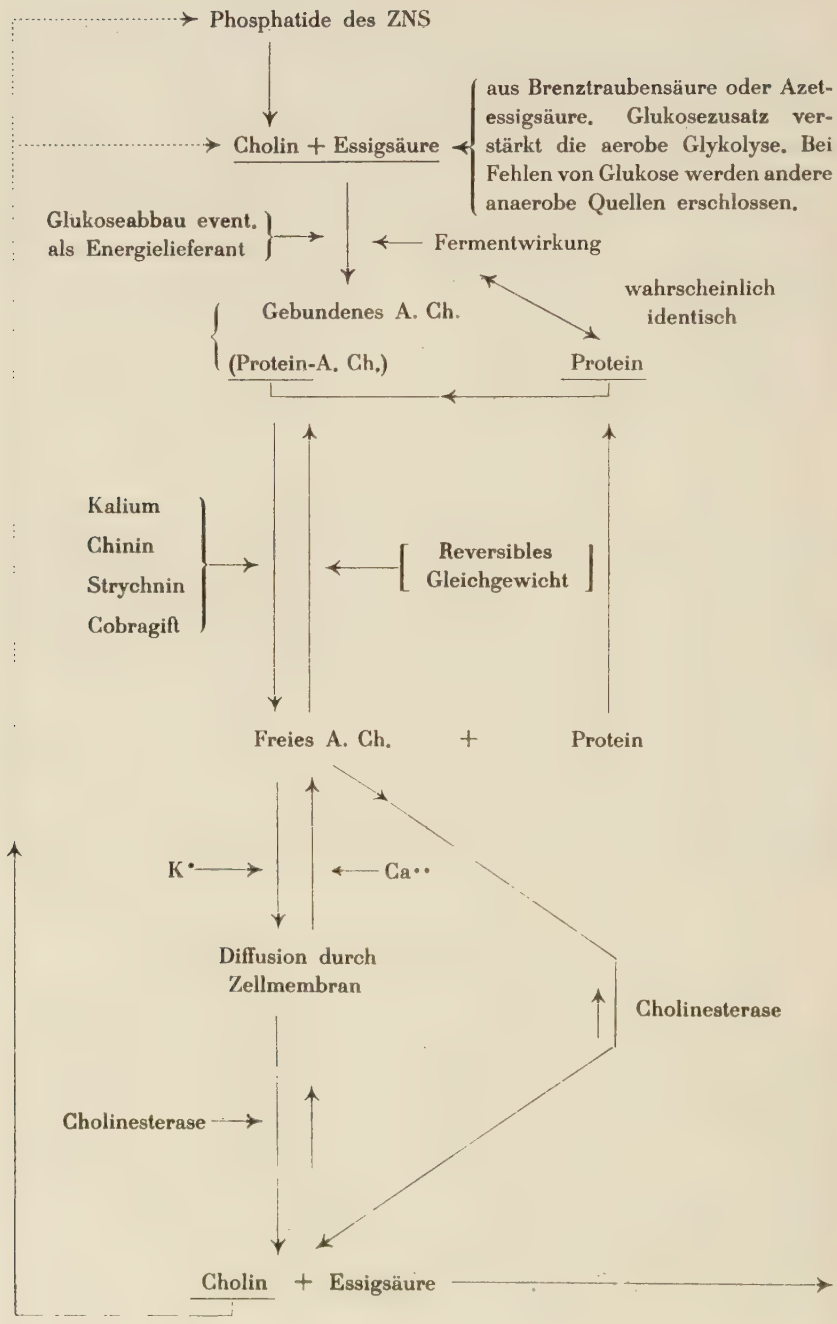
2. Atmung und Glykolyse.

Tabelle 2 zeigt, dass die Glykolyse in Gegenwart von Glukose viel grösser ist als ohne Glukose. Das Verhältnis G/R ist mit Glukose nach der 1. Stunde 0,28, ohne Glukose 0,09. Im weiteren Verlaufe verschiebt sich dieses Verhältnis, indem die entsprechenden Zahlen nach der 4. Stunde 0,19 und 0,07 sind. Interessant ist der Zusammenhang zwischen Glukosezusatz und Vergrösserung der Glykolyse einerseits und Vermehrung der Sauerstoffaufnahme andererseits. Auffallend ist die niedrige Lage der respiratorischen Quotienten des Atmungsanteils beim Umsatz. Er deutet darauf hin, dass ein grosser Teil des Sauerstoffs zur Verbrennung von Nichtkohlehydraten verbraucht wird. Dass der respiratorische Quotient in Gegenwart von Glukose grösser ist als ohne, ist verständlich. Er zeigt in beiden Fällen eine steigende Tendenz.

3. Schädigung der Atmung durch Blausäure.

Blausäure *n*/10'000 bewirkt eine Steigerung des Sauerstoffverbrauches bei Anwesenheit von Glukose. Fehlt diese, so findet eine geringe, aber deutliche Hemmung der Atmung statt. Die Steigerung, bzw. Hemmung des Sauerstoffverbrauches ist bei Wiederholung der Versuche in jedem Falle feststellbar. Die Glykolyse nimmt bei Glukosezusatz entsprechend der Atmungssteigerung zu. Bei Abwesenheit von Glukose verschwindet sie gänzlich. Der respiratorische Quotient ist in beiden Fällen etwas niedriger. Durch Blausäure in einer Konzentration von *n*/10'000 erfolgt offenbar bei Anwesenheit von Glukose eine Anregung des Stoffwechsels, wie sie Warburg bei der Atmung von Algen [22] schon gefunden hat.

Schema.


Phosphatide des ZNS
Cholin + Essigsäure
aus Brenztraubensäure oder Azetessigsäure. Glukosezusatz verstärkt die aerobe Glykolyse. Bei Fehlen von Glukose werden andere anaerobe Quellen erschlossen.
Glukoseabbau event. als Energielieferant
Fermentwirkung
Gebundenes A. Ch.
(Protein-A. Ch.)
wahrscheinlich identisch
Protein
Kalium
Chinin
Strychnin
Cobragift
Reversibles Gleichgewicht
Freies A. Ch. + Protein
K•
Ca••
Diffusion durch Zellmembran
Cholinesterase
Cholinesterase
Cholin + Essigsäure

Bei Anwendung einer Blausäurekonzentration von $n/1000$ dagegen ist eine sehr deutliche Hemmung der Atmung zu erkennen. Auffallend ist die starke Zunahme der Glykolyse — offenbar als Notreaktion — bei Gegenwart von Glukose. Sie wird bedeutend grösser als die Atmung. Das Verhältnis G/R ist nach 1 Stunde zirka 1,4, nach 2 Stunden 1,25. Der respiratorische Quotient ist vermindert und weist eine fallende Tendenz auf.

Fehlt Glukose, so wird der Stoffwechsel fast ganz unterdrückt. Neben einer ganz geringen Atmung lässt sich nur eine minimale Bildung von Säuren feststellen. Der respiratorische Quotient, der erstaunlich hoch bleibt, weist ebenfalls eine fallende Tendenz auf.

Glukosezusatz zu Gehirnbrei steigert also nicht nur die Bildung von Azetylcholin, sondern auch die Atmung und die Glykolyse. Es muss angenommen werden, dass der Aufbau von Azetylcholin durch einseitige Verschiebungen eines Gleichgewichtes zwischen gebundenem und freiem Azetylcholin gesteuert wird. Bei Gegenwart von Glukose stellt sich dieses Gleichgewicht viel schneller ein als ohne Glukose. Ob Glukose dabei direkt als Substrat für den Azetylcholin-Aufbau verwendet wird oder ob sie nur als Energielieferant für den Aufbau aus einem andern Substrat dient, ist nicht entschieden.

B. Peripherer Nerv.

1. Bildung von Azetylcholin.

Im Vergleich zum Gehirnbrei fällt auf, dass Azetylcholin vom Nervengewebe nicht im gleichen Masse gebildet wird. Der während den ersten 2 Stunden festgestellte Abfall des Total-Azetylcholingehaltes lässt sich nicht verhindern, auch nicht, wenn die Konzentration an Eserin auf 1:6000 gesteigert wird. Eine weitere Steigerung der Eserinkonzentration ist nicht möglich ohne Fälschung der Resultate, weil Eserin in höheren Konzentrationen kontrahierend auf die Blutegel wirkt.

Die stete Abnahme des Gehaltes an freiem Azetylcholin von 0,94 γ/g vor der Inkubation auf 0,20 γ/g nach 4 Stunden bei Gegenwart von Glukose (Tabelle 5) steht ganz in Gegensatz zu der entsprechenden Zunahme beim Gehirn (Tabelle 1). Die Zunahme an gebundenem Azetylcholin hingegen von 0,24 auf 1,03 γ/g nach 4 Stunden, also fast auf das Fünffache, ist bedeutend grösser als diejenige des Gehirns.

Ohne Glukose ist eine ungefähr gleich starke Abnahme an freiem Azetylcholin wie bei Gegenwart von Glukose feststellbar. Der Gehalt an gebundenem Azetylcholin fällt während der ersten 2 Stunden auch ab. Dann aber setzt eine Bildung von Azetylcholin

ein, die nach 4 Stunden, als ausserhalb der Fehlergrenzen liegend, nachweisbar ist. Es liegen keine Gründe vor zu der Annahme, dass das für die Azetylcholin-Synthese des Gehirns aufgestellte Schema (S. 54), wonach die Bildung von Azetylcholin nur über seine gebundene Form erfolgt, für den peripheren Nerven ungültig sei. Eine Abnahme des Gehaltes an freiem Azetylcholin durch Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen freiem und gebundenem Azetylcholin zugunsten des letzteren ist sehr unwahrscheinlich, da eine solche Gleichgewichtseinstellung erst erfolgt, wenn das Verhältnis freies Azetylcholin/gebundenes Azetylcholin den Wert von 2—3 erreicht hat (siehe Tabelle 1).

Der periphere Nerv ist demnach in der Lage, Azetylcholin zu synthetisieren.

Die kontinuierliche Abnahme an freiem Azetylcholin lässt auf einen Zerstörungsmechanismus schliessen, der trotz der Anwesenheit von Eserin in hohen Konzentrationen weiterwirkt. Es scheint also eine «Cholinesterase» zu geben, die durch dieses Alkaloid nicht, oder in viel geringerem Masse, vergiftet wird.

Glukose fördert im Nerven stark die Bildung von Azetylcholin. Ueber ihre Wirkung lässt sich dasselbe sagen wie beim Gehirn. Ebenso tritt bei Abwesenheit von Glukose bei einem Schwellenwert an gebundenem Azetylcholin, der allerdings viel tiefer liegt als beim Gehirn, ein neuer, anaerober Bildungsmechanismus für das Azetylcholin in Funktion, welcher die gemessene Erhöhung des Azetylcholingehaltes zur Folge hat. Als Energielieferant für diese Synthese könnte auch hier Glykogen in Frage kommen, das unter normalen Verhältnissen immobilisiert ist [67].

2. Gehalt an Aneurin (Tabelle 6).

Er ist nicht messbar verschieden bei Anwesenheit oder Fehlen von Glukose. Der Gehalt an Aneurin nimmt in 2 Stunden fast um das Doppelte zu, während derjenige von Cocarboxylase von 0,13 γ/g auf 0,01 γ/g absinkt. Der Gehalt an Cocarboxylase im peripheren Nerven ist 50 % desjenigen an Aneurin, er wird nach 2 Stunden 2 %.

Die Zunahme des Total-Aneuringehaltes von 0,39 γ/g auf 0,48 γ/g nach 2 Stunden beruht wahrscheinlich auf einer Umwandlung einer schwer extrahierbaren in eine leichter nachweisbare Verbindung des Aneurins [13].

3. Atmung und Glykolyse.

Die auffallende Hemmung der Sauerstoffaufnahme des peripheren Nerven durch Glukose hat schon R. W. Gerard [66] beobachtet. Der Sauerstoffverbrauch ist gering, bleibt aber während 4 Stunden deutlich messbar: in der 1. Stunde 22 mm^3 pro Gramm,

in der 4. noch 10 mm^3 pro Gramm. Die von Gerard gefundenen Werte liegen zwischen 20 und 16 mm^3 pro Gramm und Stunde bei intakten Nerven.

Ohne Glukose ist der Sauerstoffverbrauch im Anfang enorm gesteigert, wird aber mit der Zeit bedeutend geringer als der mit Glukose, er ist in der 4. Stunde fast null. Der Energievorrat des Nerven, der in der 1. Stunde — wohl als Notreaktion — sehr schnell aufgebraucht wird, scheint in der 4. Stunde völlig erschöpft zu sein. Die in der 4. Stunde einsetzende kräftige Neubildung von Azetylcholin (Tabelle 5) weist aber darauf hin, dass im Nerven noch beträchtliche Reserven vorliegen, die anaerob abgebaut werden können.

Der respiratorische Quotient ist sehr hoch und zeigt mit und ohne Glukose leicht fallende Tendenz. Er wird durch Zugabe von Glukose um weniges erhöht. Eine Steigerung des RQ auf 1,5 und 2, wie sie Gerard am ganzen Nerven [67] nach 4—8 Stunden infolge eines verzögerten «Kohlensäureschubes» feststellte, konnte nicht beobachtet werden. Es ist sehr schwierig, aus dem RQ einen gültigen Schluss zu ziehen auf die Natur der abgebauten Substrate (Kohlehydrate, Eiweisse oder Fette), weil die Interpretation des Abbauvorganges (ob vollständig oder unvollständig) noch zu unsicher ist. Durch die mitgeteilten Resultate kann als sehr wahrscheinlich angenommen werden, dass bei Gegenwart von Glukose diese vom Nerven in erster Linie als Substrat benützt wird. Fehlt Glukose, so werden hauptsächlich wohl Eiweisse abgebaut, was durch den RQ von 0,82—0,84 wahrscheinlich gemacht wird.

Die Glykolyse, die ohne Glukose sehr gering ist, wird auf Zusatz von Glukose enorm gesteigert (Abb. 14). Die Bildung von Milchsäure ist in der 1. Stunde 1,6mal grösser als die von Kohlensäure, nach 4 Stunden sind beide gleich gross. Ohne Glukose steigt das Verhältnis G/R von 0,17 nach der 1. Stunde auf 0,27 nach 4 Stunden (Tabelle 8), was auch auf einen anaeroben Abbau von Energiespeichern (Glykogen) hindeutet.

Es stellt sich aber die Frage, ob nicht jede Steigerung der «Glykolyse» z. T. auf eine Freisetzung von CO_2 aus dem Bicarbonatpuffer durch *Essigsäure* zurückzuführen ist. Diese Essigsäure könnte durch die Wirkung der mit Eserin nicht vergiftbaren Cholinesterase auf Azetylcholin abgespalten werden. Eine kurze Ueberschlagsrechnung aber zeigt, dass durch Hydrolyse der in Frage kommenden Mengen von Azetylcholin kein messbarer Manometerausschlag auftreten kann. Würde pro Stunde die sehr grosse Menge von z. B. 5 γ/g Azetylcholin hydrolysiert, so hätte das eine Volumzunahme pro Stunde von 0,06 mm^3 zur Folge.

VII. Zusammenfassung

A. Gehirn.

1. In einer Suspension von zerriebenem Gehirngewebe von Ratten in Lockelösung bei 37° findet in Gegenwart von Glukose 0,01 m eine kräftige Neubildung von Azetylcholin statt. Die Menge (bezogen auf 1 g Gehirngewebe) steigt von 2,9 γ vor der Inkubation auf 8,5 γ nach einer, 18,7 γ nach 2 und 19,5 γ nach 4 Stunden. Gleichzeitig findet eine starke Sauerstoffaufnahme statt.

2. Fehlt Glukose in der Suspensionsflüssigkeit, so tritt bis zur 2. Stunde keine Neubildung von Azetylcholin auf. Zwischen der 2. und 4. Stunde nimmt der Azetylcholingehalt auf das 2,5fache zu. Die Sauerstoffaufnahme ist bis zur 2. Stunde gering und sinkt dann auf 0 ab.

3. Mit Glukose ist der Gehalt an gebundenem Azetylcholin nach 2 Stunden zirka dreimal grösser, derjenige an freiem Azetylcholin beträgt das 16fache. Der in der Zeit von der 2.—4. Stunde erfolgende Stillstand der Azetylcholinbildung wird der Rückwirkung der erhöhten Konzentration an freiem Azetylcholin auf die gebundene Form zugeschrieben.

4. Ohne Glukose findet anfänglich nur eine Verlagerung von der gebundenen zur freien Form statt. Die nach der 2. Stunde einsetzende Bildung von Azetylcholin wird auf eine Mobilisierung von Reserven zurückgeführt.

5. Bei Zugabe von Blausäure *n*/10'000 zur Lockelösung erfolgt mit Glukose eine Steigerung sowohl der Atmung als auch der Glykolyse, ohne Glukose eine leichte Hemmung von Atmung und Glykolyse.

6. Bei Zugabe von Blausäure *n*/1000 erfolgt eine deutliche Hemmung des Stoffwechsels. Mit Glukose wird die Glykolyse stark erhöht.

7. Der respiratorische Quotient, auf die Atmung allein bezogen, liegt zwischen 0,7 und 0,87.

8. Die aus den Versuchen hervorgehenden Vorstellungen werden in einem Schema dargestellt.

B. Peripherer Nerv.

1. In einer Suspension von zerriebenen peripheren Nerven in Lockelösung bei 37° findet in Gegenwart von Glukose keine Zunahme von Total-Azetylcholin statt. Die Mengen betragen 1,18 γ/g vor der Inkubation, 1,04 γ/g nach einer, 1,00 γ/g nach 2 und 1,23 γ/g nach 4 Stunden. Der Sauerstoffverbrauch ist sehr gering, bleibt aber während 4 Stunden fast konstant. Er beträgt im Mittel 15 mm^3 pro Gramm und Stunde.

2. Fehlt Glukose in der Suspensionsflüssigkeit, so sinkt der Gehalt an Total-Azetylcholin auf 0,66 γ/g nach einer Stunde und 0,54 γ/g nach 2 Stunden. Er nimmt dann wieder zu und ist nach 4 Stunden 1,02 γ/g. Die Sauerstoffaufnahme ist in der ersten Stunde sehr gross: 66 mm^3 pro Gramm, wird aber mit der Zeit deutlich geringer als mit Glukose.

3. Mit Glukose steigt der Gehalt an gebundenem Azetylcholin während 4 Stunden an, er ist nach der 4. Stunde auf das Fünffache angestiegen. Nach den gemachten Beobachtungen kann diese Zunahme nur auf eine Synthese durch das Nervengewebe zurückgeführt werden.

4. Ohne Glukose nimmt anfänglich der Gehalt an gebundenem Azetylcholin ab. Die nach der 2. Stunde erfolgende Zunahme beruht auf einer ähnlichen Mobilisierung von Reserven, wie sie im Gehirn erfolgt.

5. Die sowohl mit als auch ohne Glukose beobachtete Abnahme an freiem Azetylcholin wird der Wirkung eines durch Eserin nicht vergiftbaren Zerstörungsmechanismus auf das freie Azetylcholin zugeschrieben.

6. Eine deutliche Freisetzung von Aneurin oder eines Aneurinderivates aus Cocarboxylase ist feststellbar. Sie ist unabhängig von der Gegenwart von Glukose.

7. Der respiratorische Quotient, auf die Atmung allein bezogen, ist höher als beim Gehirn; er liegt bei Anwesenheit von Glukose zwischen 0,92 und 0,96, ohne Glukose zwischen 0,82 und 0,87. Durch Glukosezusatz wird die Milchsäurebildung sehr stark erhöht.

VIII. Literatur

[1] *Stedman E.* and *E.:* Biochem. J. *29,* 2107 (1935).
[1a] *Downing A. C., Gerard R. W.* und *Hill A. V.:* Proc. Roy. Soc. *100,* 223 (1926).
[2] *Quastel J. H., Tennebaum M.* and *Wheatley A. H. M.:* Biochem. J. *30,* 1668 (1936).
[3] *Mann P. J. G., Tennebaum M.* and *Quastel J. H.:* Biochem. J. *32,* 243 (1938).
[4] *Mann P. J. G., Tennebaum M.* and *Quastel J. H.:* Biochem. J. *33,* 822 (1939).
[5] *Stedman E.* and *E.:* Biochem. J. *31,* 817 (1937).
[6] *Stedman E.* and *E.:* Biochem. J. *33,* 811 (1939).
[7] *McIntosh F. C.:* J. of Physiol. *93,* 46 (1938).
[8] *Kahlson G.* and *McIntosh F. C.:* J. of Physiol. *96,* 277 (1939).
[9] *Muralt A. v.:* Naturwiss. *27,* 265 (1939).
[10] *Dale H.:* Lancet *216,* 1285 (1929).
[11] *Lœwi O.:* Harvey Lectures, Baltimore 1932/1933.
[12] *Lissak K.:* Amer. J. Physiol. *125,* 778 (1939).
[13] *Muralt A. v.:* Pflüg. Arch. *245,* 604 (1942).
[14] *Brecht K.* und *Corsten M.:* Pflüg. Arch. *245,* 160 (1941).
[14a] *Dijkstra C.* und *Noyons A. K. M.:* Arch. internat. Physiol. *49,* 257 (1939).
[15] *Mann P. J. G., Tennebaum H.* und *Quastel J. H.:* Biochem. J. *32,* 243 (1938).
[16] *Minz B.:* C. r. Soc. Biol. Paris *127,* 1251 (1938).
[17] *Brücke F. v.* und *Sarkander H.:* Arch. f. Exper. Path. *195,* 218 (1940).
[18] *Warburg E.:* Sitzungsber. der Preuss. Akad. d. Wiss. *34,* 712 (1900).
[19] *Warburg E.:* Ann. Physik, 4. Folge *9,* 781 (1902).
[20] *Barcroft:* Journ. of physiol. *37,* 12 (1908).
[21] *Haldane* und *Barcroft:* Journ. of physiol. *28,* 232 (1902).
[22] *Warburg O.:* Biochem. Zeitschr. *100,* 230 (1919).
[23] *Warburg O.:* Ueber den Stoffwechsel der Tumoren. Julius Springer Verlag, Berlin 1926.
[24] *Krebs H. A.:* Methodik der wissenschaftlichen Biologie, Péterfi. Julius Springer, Berlin 1928.
[25] *Warburg O.:* Biochem. Zeitschr. *142,* 317 (1923).
[26] *Hastings A. B.* und *Sendroy J.:* J. of Biol. Chem. *65,* 445 (1925).
[27] *Warburg O.:* Biochem. Zeitschr. *152,* 51 (1924).
[28] *Stedman E.* und *E.* und *Easson L.:* Biochem. J. *26,* 2056 (1932).
[29] *Süllmann* und *Birkhäuser:* Schw. med. Wschr. 648 (1939).
[30] *Massart* und *Dufait:* Enzymologia *7,* 384 (1939).
[31] *Massart* und *Dufait:* Enzymologia *8,* 392 (1940).
[32] *Ammon R.:* Pflüg. Arch. *233,* 486 (1934).
[33] *Marnay A.* und *Nachmansohn D.:* J. of Physiol. *89,* 359 (1937).
[34] *Beattie:* Biochem. J. *30,* 1554 (1936).
[35] *Bischoff, Grab* und *Kapfhammer:* Z. physiol. Chem. *200,* 153 (1931).

[36] *Hunt:* J. of pharm. and exp. Ther. *7*, 301 (1915).
[37] *Fühner H.:* Biochem. Z. *77*, 408 (1916).
[38] *Guggenheim* und *Löffler:* Biochem. Z. *74*, 208 (1916).
[39] *Fühner H.:* Arch. f. exper. Path. *82*, 81 (1918).
[40] *Minz B.:* Arch. f. exper. Path. *167*, 85, *168*, 292 (1932).
[41] *Chang H. C.* und *Gaddum J. H.:* J. of Physiol. *79*, 255 (1933).
[42] *Dale H.:* Reizübertragung durch chemische Mittel im peripheren Nervensystem. Berlin 1935.
[43] *Feldberg W.* und *Krayer O.:* Arch. f. exper. Path. *172*, 170 (1933).
[44] *Gaddum J. H.:* Gefässerweiternde Stoffe. Leipzig 1936.
[45] *Gaddum J. H.:* Med. Res. Coun. Spec. Rep. *183* (1933).
[46] *Dale H. H.* und *Richards A. N.:* J. of Physiol. *52*, 110 (1918).
[47] *Kuhn R.:* Zeitschr. physiol. Chemie *234*, 196 (1935).
[48] *Jansen B. C. P.:* Rec. trav. chim. Pays Bas *55*, 1046 (1936).
[49] *Jansen B. C. P.:* Zeitschr. f. Vitaminforschung *7*, 239 (1938).
[50] *Cohen F.:* Rec. trav. chim. Pays Bas *54*, 133 (1935).
[51] *Karrer W.* und *Kubli U.:* Helv. chim. Acta *20*, 369 (1937).
[52] *Karrer W.:* Helv. chim. Acta *20*, 1147 (1937).
[53] *Ritsert K.:* Dtsch. med. Wschr. *14*, 481 (1938).
[54] *Otto H.* und *Rühmekorb F.:* Klin. Wschr. *17*, 1246 (1938).
[55] *Harris L. J.* und *Wang Y. L.:* Bioch. J. *35*, 1050 (1941).
[56] *Kinnersley H.* und *Peters R.:* Bioch. J. *28*, 667 (1934).
[57] *Kinnersley H.* und *Peters R.:* Bioch. J. *29*, 2369 (1935).
[58] *Kinnersley H.* und *Peters R.:* Bioch. J. *32*, 1516 (1938).
[59] *Wang Y. L.* und *Harris L. J.:* Bioch. J. *33*, 8, 1356 (1939).
[60] *Ritsert K.:* Klin. Wschr. *17*, 1397 (1938).
[61] *Ritsert K.:* Klin. Wschr. *18*, 852 (1939).
[62] *Ritsert K.:* Klin. Wschr. *18*, 1370 (1939).
[63] *Ritsert K.:* Klin. Wschr. *19*, 446 (1940).
[64] *Page J. H.:* Chemistry of the brain. Springfield: C. C. Thomas, 1938.
[65] *Geiger A.* und *Magnes I.:* Biochem. J. *33*, 866 (1939).
[66] *Gerard R. W.:* Am. J. Physiol. *82*, 381 (1927).
[67] *Gerard R. W.:* Physiol. Rev. *12*, 469 (1932).

Lebenslauf

Mein Vater José Sanz y Arizmendi, gebürtig aus Sevilla, war Kunstmaler und Architekt (ETH Zürich). Er hat im Jahre 1929 das Schweizerbürgerrecht erworben und ist am 17. Dezember des gleichen Jahres gestorben. Meine Mutter ist gebürtige Schweizerin.

Am 13. Mai 1916 wurde ich, *Manuel Claudio Sanz*, in Zürich geboren und verbrachte die ersten sechs Jahre in Madrid. 1922 zogen wir in die Schweiz. Die Primarschule besuchte ich in Konolfingen, Bolligen und Ermatingen. Es folgten ein Jahr Sekundarschule in Bolligen, ½ Jahr Primarschule in Rovio (Tessin), 2½ Jahre am Städtischen Progymnasium in Bern und 4½ Jahre an der Literarabteilung des Städtischen Gymnasiums, wo ich im Herbst 1935 die Maturitätsprüfung bestand. Anschliessend arbeitete ich ein halbes Jahr im «Institut Agricole d'Algérie» in Maison-Carrée bei Algier, wo ich landwirtschaftliche Studien betrieb.

Im Frühling 1936 immatrikulierte ich mich an der philosophischen Fakultät II der Universität Bern, wo ich mich dem Studium der Chemie widmete. Wegen Aktivdienstes wurde das Studium mehrfach für kürzere Zeit unterbrochen. Im Januar und Sommersemester 1943 arbeitete ich im chemischen Institut der Universität Zürich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Karrer an der Isolierung und Konstitutionsaufklärung einer neuen chemischen Verbindung.